



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁵ : C12N 1/06, C07K 3/08, 15/00 C07K 13/00, A61K 39/21, 39/145 G01N 33/569	A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 94/00557 (43) Date de publication internationale: 6 janvier 1994 (06.01.94)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR93/00654 (22) Date de dépôt international: 29 juin 1993 (29.06.93) (30) Données relatives à la priorité: 92/08051 30 juin 1992 (30.06.92) FR (71) Déposant (FR seulement): CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE [FR/FR]; 15, quai Anatole-France, F-75700 Paris (FR). (71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf FR US): PASTEUR MERIEUX SERUMS ET VACCINS [FR/FR]; 58, avenue Leclerc, B.P. 7046, F-69348 Lyon Cédex 07 (FR). (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement) : MADJAR, Jean-Jacques [FR/FR]; 10, rue Bellecordière, F-69002 Lyon (FR). POLY, Hervé [FR/FR]; 3, rue Rigot-Vitton, F-69270 Fontaines-sur-Saône (FR).		(74) Mandataire: DEMACHY, Charles; Grosset-Fournier & Demachy s.a.r.l., 103, rue La Fayette, F-75010 Paris (FR). (81) Etats désignés: AU, CA, JP, US, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale.</i>
(54) Title: METHOD FOR PREPARING MEMBRANE PROTEINS AND PRESERVING THEIR OLIGOMERIC STRUCTURES UNDER DENATURING CONDITIONS, AND USES OF SAID PROTEINS IN DIAGNOSTICS AND VACCINATION (54) Titre: PROCEDE D'OBTENTION DE PROTEINES MEMBRANAIRES, PERMETTANT LE MAINTIEN DES STRUCTURES OLIGOMERIQUES DE CES PROTEINES EN CONDITIONS DENATURANTES, ET UTILISATION DE CES PROTEINES DANS UN BUT DE DIAGNOSTIC OU DE VACCINATION (57) Abstract <p>A method for the lysis of micro-organisms such as viruses, in particular for preparing and, if required, purifying membrane proteins in said micro-organisms, wherein any proteins which may be present in oligomeric form are preserved in that form while the infectiousness of the micro-organisms is destroyed. Said method is characterized in that it includes the step of treating said micro-organisms with a composition containing a combination of at least two different amphipathic molecules. The use of the resulting oligomeric proteins in diagnostic methods or vaccine compositions is also disclosed.</p> (57) Abrégé <p>L'invention a pour objet un procédé de lyse de micro-organismes, tels que les virus, notamment aux fins d'obtention et, le cas échéant de purification des protéines à localisation membranaire chez ces micro-organismes, ce procédé permettant de maintenir sous forme oligomérique celles des protéines susceptibles d'être présentes sous une telle forme dans ces micro-organismes tout en détruisant le pouvoir infectieux de ces micro-organismes, lequel procédé est caractérisé en ce qu'il comprend une étape de traitement de ces micro-organismes à l'aide d'une composition contenant une association d'au moins deux molécules différentes au caractère amphipathique. L'invention vise également l'utilisation des protéines oligomériques obtenues par ce procédé pour la mise en œuvre de méthodes de diagnostic, ou dans des compositions vaccinales.</p>		

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Autriche	FR	France	MR	Mauritanie
AU	Australie	GA	Gabon	MW	Malawi
BB	Barbade	GB	Royaume-Uni	NE	Niger
BE	Belgique	GN	Guinée	NL	Pays-Bas
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	NO	Norvège
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	NZ	Nouvelle-Zélande
BJ	Bénin	IE	Irlande	PL	Pologne
BR	Brésil	IT	Italie	PT	Portugal
BY	Bélarus	JP	Japon	RO	Roumanie
CA	Canada	KP	République populaire démocratique de Corée	RU	Fédération de Russie
CF	République Centrafricaine	KR	République de Corée	SD	Soudan
CG	Congo	KZ	Kazakhstan	SE	Suède
CH	Suisse	LJ	Liechtenstein	SI	Slovénie
CI	Côte d'Ivoire	LK	Sri Lanka	SK	République slovaque
CM	Cameroun	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
CN	Chine	LV	Lettonie	TD	Tchad
CS	Tchécoslovaquie	MC	Monaco	TG	Togo
CZ	République tchèque	MG	Madagascar	UA	Ukraine
DE	Allemagne	ML	Mali	US	Etats-Unis d'Amérique
DK	Danemark	MN	Mongolie	UZ	Ouzbékistan
ES	Espagne			VN	Viet Nam
FI	Finlande				

PROCEDE D'OBTENTION DE PROTEINES MEMBRANAIRES, PERMETTANT LE MAINTIEN DES STRUCTURES OLIGOMERIQUES DE CES PROTEINES EN CONDITIONS DENATURANTES, ET UTILISATION DE CES PROTEINES DANS UN BUT DE DIAGNOSTIC OU DE VACCINATION.

L'invention a pour objet un procédé d'obtention de protéines oligomériques, et plus particulièrement celles à localisation membranaire dans les cellules, micro-organismes (notamment les virus) ou hôtes cellulaires infectés par ces micro-organismes, ce procédé permettant le maintien de ces protéines sous forme oligomérique.

L'invention a également pour objet les utilisations de ces protéines oligomériques ainsi obtenues, notamment pour la mise en oeuvre de méthodes de diagnostic de pathologies causées par l'infection d'un individu par des micro-organismes porteurs de telles protéines, ou encore dans le cadre de la vaccination contre ce type d'infection.

De nombreuses protéines à localisation membranaire dans les cellules ou les micro-organismes sont sous forme oligomérique. A titre illustratif, on peut citer parmi les micro-organismes susceptibles de posséder des protéines oligomériques membranaires, les virus responsables du syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA).

Dans le cas de la recherche d'une infection par HIV, une sérologie trouvée positive au dépistage, généralement par des tests de diagnostic de type ELISA, ne permet pas, à elle seule, d'affirmer la contamination par le virus. Deux méthodes concurrentes sont utilisées pour la confirmation. La première, réputée la plus performante, est connue sous l'abréviation de RIPA ("radio-immuno precipitation assay") car elle fait appel à l'immuno-précipitation des protéines virales préalablement marquées par un isotope radioactif (ici la ^{35}S -cystéine). La seconde méthode est désignée par l'expression "western blot". En pratique, elle met en oeuvre l'immuno-détection par les anticorps du sérum à analyser, des protéines virales séparées par électrophorèse et transférées sur une feuille de nitrocellulose ou tout autre support équivalent. Dans les deux cas, il faut cultiver le virus comme source d'antigène mais, le RIPA n'est réalisable qu'en laboratoire spécialisé ayant à sa disposition l'équipement et la structure permettant la culture et le marquage du virus en conditions réglementées, tandis que le "western blot" peut être utilisé dans n'importe quel laboratoire auquel est fourni la membrane portant les protéines antigéniques virales déjà séparées par électrophorèse.

La glycoprotéine de l'enveloppe de HIV-1 est codée par le gène "env", et la traduction de l'ARNm correspondant donne une protéine glycosylée, gp160, sous forme d'un précurseur dont la masse moléculaire est de 160 kDa. La gp160 est clivée à l'intérieur de la cellule pour donner, au niveau de la membrane cytoplasmique lors du bourgeonnement du virus en cours de formation, d'une part la gp120 que l'on retrouve à l'extérieur de la cellule et du virus, et, d'autre part, la gp41, partie transmembranaire de la glycoprotéine, qui correspond à l'extrémité carboxy-terminale du précurseur. Une fois la particule virale libérée, la gp41 seule protéine transmembranaire, présentera son extrémité carboxy-terminale tournée vers l'intérieur du virus et son extrémité amino-terminale faisant saillie à l'extérieur, se maintenant associée de façon non covalente à la gp120. La gp120 se comporte comme une molécule bi-fonctionnelle. Par son extrémité amino-terminale, elle est fixée à la gp41 alors que son extrémité carboxy-terminale reconnaît la région située entre les résidus 32 et 47 de la molécule CD4 (spécifique des lymphocytes T4 auxiliaires, macrophages...). La liaison de la gp120 au CD4 permet d'exposer la membrane de la cellule cible à la partie hydrophobe amino-terminale de la gp41, ce qui semble induire le mécanisme de fusion des membranes du virus et des cellules, cette fusion étant à l'origine de la pénétration du virion dans la cellule cible lors de l'infection (pour revues, voir Evans et Levy, 1989; Wong-Staal et Haseltine, 1992).

Ce processus de reconnaissance du récepteur viral, suivi de la fusion des membranes grâce à l'interaction de l'extrémité amino-terminale de la protéine de fusion avec la membrane de la cellule cible, n'est pas un mécanisme propre à HIV. Il est possible grâce à la présence, sous forme oligomérique, des glycoprotéines trans-membranaires du virus. Des pontages par agents chimiques ont permis de mettre en évidence des trimères au niveau des glycoprotéines de l'enveloppe de MuLV (Takemoto et col., 1978; Pinter et Fleissner, 1979), de MuMTV (Racevskis et Sarkar, 1980). Il a aussi été montré que la protéine de l'enveloppe de RSV forme des oligomères retrouvés dans les cellules infectées et les particules virales (Einfeld et Hunter, 1988). Le virus de l'influenza exprime également à sa surface une hémagglutinine sous forme trimérique (Doms et Helenius, 1986). Dans ce dernier cas, la forme multimérique est nécessaire au transport intracellulaire de la protéine (Copeland et col., 1986; Gething et col., 1986). L'influenza exprime aussi à sa surface une neuraminidase sous forme de tétramère (Varghese et col., 1983). Le virus de la stomatite vésiculaire (VSV) exprime également une glycoprotéine sous forme oligomérique et, dans ce cas, l'association des monomères est indispensable au transport de la protéine du réticulum endoplasmique vers l'appareil de Golgi (Kreis et Lodish, 1986). L'oligomérisation de la glycoprotéine

transmembranaire se retrouve également dans les paramyxovirus, tel que le virus de Sendaï et dans le virus des oreillons.

Les auteurs de la présente invention ont mis en évidence le fait qu'il est possible, dans des conditions bien déterminées, et même en conditions dénaturantes, d'isoler des formes oligomériques de cette gp41 de HIV-1 (et plus particulièrement un trimère de 120kDa et un tétramère de 160kDa) qui sont donc des protéines différentes des gp120 et gp160 susmentionnées.

Les structures oligomériques des protéines, et plus particulièrement des protéines membranaires, représentent des formes moléculaires caractéristiques de certaines catégories de cellules, micro-organismes ou hôtes cellulaires infectés par ces micro-organismes, et sont par conséquent des composants particulièrement avantageux à utiliser:

- dans le cadre d'un dépistage de pathologies causées par l'infection d'un individu par ces micro-organismes (notamment par détection d'anticorps dirigés contre ces protéines dans les sérums des individus infectés), et plus spécifiquement dans le cadre d'un test de confirmation des méthodes classiques de dépistage de ces infections,

- ou encore dans le cadre de la vaccination destinée à prévenir de telles infections.

Toutefois, les méthodes existant actuellement pour l'isolement des protéines à partir de cellules ou micro-organismes, en vue notamment de leur obtention, détruisent ces structures oligomériques pour donner naissance à des formes monomériques dont l'utilisation ne permet pas toujours de conclure de façon certaine à une infection, ni d'obtenir une vaccination efficace contre ces infections.

Or la présente invention a précisément pour but de fournir un procédé d'isolement de protéines à partir de cellules, micro-organismes ou hôtes cellulaires infectés par ces micro-organismes, qui présente l'avantage de permettre le maintien sous forme oligomérique de celles des protéines existant sous une telle forme dans ces cellules, micro-organismes ou hôtes cellulaires infectés par ces micro-organismes.

L'invention a également pour but de mettre à la disposition du public des méthodes de diagnostic *in vitro*, notamment chez l'Homme, d'infections causées par ces micro-organismes, et plus particulièrement des tests de diagnostic et de confirmation, notamment dans le cadre de l'infection par HIV, qui soient plus performants et plus fiables que les méthodes de diagnostic ou tests de confirmation actuels.

L'invention a également pour but de fournir de nouvelles compositions vaccinales à base de protéines oligomériques, notamment dans le cadre de la vaccination contre les infections par HIV.

5 L'invention a également pour but de fournir des compositions pour la mise en oeuvre d'un tel procédé d'isolement de protéines sous forme oligomérique.

L'invention a pour objet un procédé de lyse de cellules ou de micro-organismes, notamment de virus, ou d'hôtes cellulaires infectés par ces micro-organismes, aux génomes modifiés ou non, ce procédé permettant de maintenir sous forme oligomérique celles des protéines susceptibles d'être présentes sous une
10 telle forme dans les cellules, micro-organismes ou hôtes cellulaires susmentionnés, tout en détruisant le pouvoir infectieux de ces micro-organismes, lequel procédé est caractérisé en ce qu'il comprend une étape de traitement de ces cellules, micro-organismes ou hôtes cellulaires à l'aide d'une composition contenant une association d'au moins deux molécules différentes au caractère amphipathique,
15 chacune de ces molécules comprenant une partie hydrophobe et une partie hydrophile.

Le procédé de l'invention permet avantageusement de détruire le pouvoir infectieux des micro-organismes, et plus particulièrement des virus (on parlera encore d'inactivation des particules infectieuses), tout en maintenant tout ou partie
20 des propriétés immunogènes des protéines des micro-organismes, notamment grâce au maintien de leur structure oligomérique.

Par propriétés immunogènes des protéines, on entend plus particulièrement leurs propriétés d'induction de la formation d'anticorps, chez un individu, susceptibles de protéger ce dernier contre l'infection par le micro-organisme dont
25 sont issues les protéines susmentionnées, ou par un micro-organisme apparenté.

L'inactivation des particules infectieuses est obtenue par solubilisation des protéines non oligomériques dont l'activité biologique est liée au pouvoir infectieux, notamment des protéines à activité polymérasique nécessaires à la réplication des particules virales, telles que l'ADN ou l'ARN polymérase.

30 Les protéines non oligomériques ainsi solubilisées dans le cadre du procédé de l'invention, perdent certaines de leurs propriétés physico-chimiques, dont celles liées au pouvoir infectieux des particules les contenant, tout en conservant tout ou partie de leurs propriétés immunogènes.

Une caractéristique particulièrement avantageuse de l'invention est que le
35 procédé de lyse susmentionné est réalisable à température ambiante.

L'invention vise plus particulièrement l'application d'un tel procédé de lyse aux fins de séparation des protéines oligomériques à localisation membranaire dans

les cellules, micro-organismes ou hôtes cellulaires susmentionnés, aux fins d'obtention et, le cas échéant de purification de ces protéines.

Par séparation des protéines membranaires ci-dessus, il faut entendre la possibilité de séparer l'ensemble des différentes protéines oligomériques présentes dans le milieu sur lequel est appliqué le procédé de lyse susmentionné, des autres constituants, protéiques ou non, de ces cellules, micro-organismes ou hôtes cellulaires, et, le cas échéant, la possibilité de séparer ces différentes protéines oligomériques entre elles.

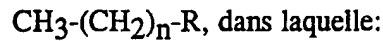
Si nécessaire, le procédé de l'invention comprend une étape supplémentaire de traitement par un agent chimique pontant tel que le formaldéhyde, cette étape étant effectuée après avoir utilisé le procédé de lyse susmentionné selon l'invention.

L'association des deux molécules amphipathiques utilisées dans le procédé de l'invention permet à la fois la solubilisation des protéines susceptibles d'être présentes sous forme oligomérique dans les cellules, micro-organismes ou hôtes cellulaires infectés par ces micro-organismes, et la reconstitution d'un environnement analogue à celui trouvé dans la membrane de ces cellules, micro-organismes ou hôtes cellulaires, cet environnement étant nécessaire au maintien de ces structures oligomériques. Un des mécanismes possibles à l'origine de la reconstitution d'un tel environnement serait que l'une de ces deux molécules soit un composé (ci-après désigné par premier composé) se substituant aux phospholipides et glycolipides membranaires, tandis que l'autre soit un composé (ci-après désigné par second composé) se substituant au cholestérol membranaire.

Le procédé de lyse de l'invention est davantage caractérisé en ce que l'une au moins des deux molécules de la composition utilisée pour le traitement des cellules, micro-organismes ou hôtes cellulaires, à savoir le premier composé susmentionné, possède la propriété, lorsqu'il est utilisé en dehors de l'association définie ci-dessus avec le second composé, de solubiliser l'ensemble des protéines présentes dans ces cellules, micro-organismes ou hôtes cellulaires, et de dissocier les protéines qui sont sous forme oligomérique (ce qui conduit aux structures monomériques de ces protéines), ce composé étant utilisé dans l'association définie ci-dessus avec le second composé dans des proportions telles qu'il conserve la propriété de solubiliser les protéines présentes dans ces cellules, micro-organismes ou hôtes cellulaires, et donc d'inactiver les particules infectieuses, tout en autorisant le maintien sous forme oligomérique de celles des protéines susceptibles d'être sous une telle forme dans ces cellules, micro-organismes ou hôtes cellulaires.

Avantageusement, le premier composé défini ci-dessus est constitué d'une ou plusieurs chaînes hydrocarbonées, hydrophobes saturées ou insaturées, ramifiées ou non, et d'une tête polaire reliant entre elles ou non ces chaînes hydrophobes.

Le premier composé est avantageusement choisi parmi les composés
5 répondant à la formule suivante:



- R représente un groupe sulfate, phosphate, ou un halogène, notamment le chlore ou le brome,

- n est supérieur ou égal à 4, et de préférence compris entre 10 et 18.

10 De préférence le premier composé est choisi parmi les sels de dodécyl sulfate, notamment le dodécyl sulfate de sodium (SDS) ou de lithium. A titre illustratif, le premier composé peut également être choisi parmi les sels de dioctyl sulfosuccinate (de sodium par exemple), les sels de cetyltriméthylammonium (de brome par exemple), les sels de cetylpyridinium (de chlore par exemple), les N-
15 dodécyl- ou N-tétradécyl-sulfobétaïne, l'octylglucoside, le lauryl maltoside, l'oxyde de lauryldiméthylamine, le décanoyl-N-méthylglucamide, et les polyéthylène glycol (n) lauryl éther.

Avantageusement le second composé utilisé dans l'association définie ci-dessus avec le premier composé, possède la propriété de solubiliser les protéines
20 oligomériques membranaires en les maintenant sous forme oligomérique, tout en conservant tout ou partie de leur activité biologique, et plus particulièrement tout ou partie de leurs propriétés immunogènes.

Un second composé particulièrement avantageux a pour structure de base hydrophobe le noyau gonane, constitué de 4 noyaux cycliques A, B, C et D, à 17
25 atomes de carbone, constituant la structure de base du cholestérol, portant ou non des groupements hydrocarbonés branchés en 10 ou en 13, ainsi que des groupements hydrophiles sur certains des 17 atomes de carbone, en alpha ou bêta, principalement en 3, 7, 12, estérifiés ou non, cette structure de base étant associée ou non à une autre tête polaire branchée sur le noyau cyclique D en 15, 16 ou 17,
30 directement ou non par l'intermédiaire d'une chaîne hydrocarbonée.

Un second composé préféré est représenté par le 3-[(3-cholamidopropyl)-diméthylamino]-1-propane sulfonate (ou CHAPS), ou encore par le 3-[(3-cholamidopropyl)-diméthylamino]-2-hydroxy-1-propane sulfonate (ou CHAPSO).
A titre illustratif le second composé peut également être choisi parmi les sels des
35 acides biliaires, cholique et désoxycholique, chénodésoxycholique ou lithocholique (de sodium par exemple), les sels des acides biliaires conjugués taurocholique ou glycocholique (de sodium par exemple), et la digitonine.

Les différentes cellules sur lesquelles le procédé de l'invention peut être appliqué, sont représentées par toute cellule du corps humain ou animal ou encore les cellules végétales, aux génomes modifiés ou non, notamment par mise en oeuvre de manipulations génétiques ou par mutation. Ces cellules peuvent également être infectées par des micro-organismes tels que décrits ci-dessous.

Les micro-organismes sur lesquels le procédé de lyse de l'invention est susceptible d'être appliqué sont représentés notamment par les bactéries ou les virus humains ou animaux (ou encore de végétaux) présentant des glycoprotéines d'enveloppe susceptibles d'être sous forme oligomérique. Dans le cas où ces micro-organismes sont des virus, ces derniers peuvent être responsables de la fusion des membranes virus-hôte lors de l'infection, et sont plus particulièrement représentés par les rétrovirus humains du type HIV-1, HIV-2 et HTLV-I, HTLV-II, les myxovirus, notamment les virus de l'influenza, les paramyxovirus, notamment le virus des oreillons et le virus de la rougeole.

Le procédé de lyse selon l'invention est avantageusement appliqué aux différents types de virus responsables du SIDA, HIV 1 ou HIV-2 ou un mélange de ces derniers, en vue de la séparation, pour ce qui concerne HIV-1, d'une part de la protéine d'enveloppe transmembranaire de HIV-1, de 41kDa décrite ci-dessus et connue sous le nom de gp41 (responsable de la fusion des membranes avec les cellules cibles lors de l'infection), sous forme oligomérique, c'est à dire trimérique de 120kDa et plus particulièrement tétramérique de 160 kDa, et d'autre part des autres protéines entrant dans la composition du virion, notamment les produits des gènes viraux "gag", "pol" et "env", y compris la gp120 (autre produit de clivage décrit ci-dessus du précurseur de la protéine d'enveloppe gp160 et qui est responsable de la reconnaissance de la cellule cible CD4 positive) sous forme monomérique.

Pour ce qui concerne HIV-2, l'application du procédé de l'invention permet la séparation d'une part des formes oligomériques de la protéine d'enveloppe de 36kDa connue sous le nom de gp36 et, d'autre part des autres protéines constitutives du virion de façon analogue à celles de HIV-1.

Le procédé de lyse selon l'invention peut également être appliqué aux différents types de myxovirus responsables de la grippe ou influenza, avec possibilité de séparer, d'une part la protéine d'enveloppe HA aux propriétés hémagglutinantes sous forme oligomérique et plus particulièrement trimérique et, d'autre part, les autres protéines entrant dans la composition du virion, elles-mêmes sous forme oligomérique (comme la protéine NP par exemple) ou non oligomérique.

L'invention a également pour objet un procédé d'obtention de protéines sous leur forme oligomérique telle qu'existante dans la membrane de cellules ou dans la membrane de micro-organismes, caractérisé en ce qu'il comprend une étape de lyse des cellules, des micro-organismes, notamment de virus, ou des hôtes cellulaires infectés par ces micro-organismes, suivant le procédé de l'invention décrit ci-dessus, le cas échéant suivie d'une étape de séparation proprement dite des protéines obtenues lors de l'étape précédente, notamment par électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de dodécyl sulfate de sodium par exemple, permettant la séparation des protéines en fonction de leur masse moléculaire, les protéines sous forme oligomérique restant associées sous une telle forme.

Avantageusement le procédé susmentionné peut être utilisé dans le but d'obtenir lesdites protéines oligomériques sous forme purifiée, notamment en faisant suivre l'étape de lyse ou celle de séparation précédemment décrites, par une étape de purification, notamment par immuno-affinité ou par séparation moléculaire et recueil de la (ou des) fraction(s) contenant la (ou les) protéine(s) oligomérique(s) recherchée(s) purifiée(s).

Il va de soi que la réalisation, après l'étape de lyse susmentionnée, de la purification des protéines permet d'obtenir une composition comprenant différentes protéines oligomériques en association, tandis que la réalisation de cette étape de purification après celle de séparation permet d'obtenir des protéines oligomériques isolées et purifiées.

L'invention a également pour objet les protéines oligomériques telles qu'obtenues par mise en oeuvre du procédé susmentionné de l'invention.

L'invention vise plus spécifiquement le trimère de 120kDa et le tétramère de 160kDa de HIV-1 susmentionnés sous forme purifiée, ou encore les formes oligomériques de la gp36 de HIV-2 susmentionnées, tels qu'obtenus par mise en oeuvre du procédé de lyse de l'invention suivi d'une étape de purification, de la manière décrite ci-dessus, de ces protéines oligomériques ainsi obtenues, lesdites protéines présentant la caractéristique d'être stables à température ambiante en présence de quantités de SDS supérieures ou égales à environ 0,5%, notamment d'environ 1%, et de quantités de CHAPS qui soient au moins du même ordre que celles de SDS.

L'invention vise plus particulièrement des compositions de protéines sous forme oligomérique obtenues par mise en oeuvre d'un procédé tel que décrit ci-dessus de lyse de virus du type HIV, ou d'hôtes cellulaires susceptibles de contenir de tels virus, et le cas échéant purifiées, ces compositions comprenant soit des protéines oligomériques différentes entre elles en association, soit des protéines oligomériques identiques isolées.

L'invention vise notamment des compositions comprenant le trimère de la protéine d'enveloppe transmembranaire de HIV-1 de 41kDa (ou gp41), à savoir le trimère de 120kDa décrit ci-dessus, et/ou le tétramère de cette gp41, à savoir le tétramère de 160kDa décrit ci-dessus, et/ou une ou plusieurs formes oligomériques de la gp36 de HIV-2 susmentionnées.

L'invention vise encore des compositions comprenant les protéines oligomériques, et plus particulièrement trimérique, de la protéine HA des myxovirus tels que ceux responsables de la grippe ou influenza.

L'invention vise également l'application de compositions comprenant une ou plusieurs protéines oligomériques, et obtenues selon le procédé décrit ci-dessus pour la mise en oeuvre de méthodes de diagnostic ou de tests de confirmation in vitro de pathologies causées par l'infection d'individus (homme ou animal) par des micro-organismes susceptibles d'être porteurs de telles protéines oligomériques.

A ce titre, l'invention a pour objet toute méthode de diagnostic ou tout test de confirmation susmentionnés, et réalisés par détection des anticorps reconnus spécifiquement par ces protéines oligomériques et susceptibles d'être présents dans des échantillons biologiques, notamment dans du sérum, provenant d'individus eux-mêmes susceptibles d'être infectés par les micro-organismes en question (notamment ceux décrits ci-dessus).

L'invention concerne plus particulièrement toute méthode de diagnostic in vitro des infections causées par les différents virus du type HIV, et qui sont à l'origine du SIDA, chez l'Homme ou chez l'animal, ou tout test de confirmation de ces infections, comprenant le cas échéant une étape d'application du procédé de lyse de l'invention sur les virus du SIDA ou sur les cellules infectées par ces derniers susceptibles d'être contenus dans un échantillon biologique, notamment dans le sérum, prélevé chez un individu, et une étape de détection des anticorps susmentionnés à l'aide d'une ou plusieurs protéines sous forme oligomérique telles qu'obtenues par mise en oeuvre du procédé de lyse susmentionné.

L'invention a également pour objet toute composition comprenant:

- au moins un premier composé, choisi parmi ceux décrits ci-dessus, susceptible de solubiliser les protéines présentes dans des cellules, micro-organismes, notamment des virus, ou hôtes cellulaires infectés par ces micro-organismes, et de dissocier (lorsqu'il est utilisé seul ou en très large excès par rapport au second composé) les protéines qui sont sous forme oligomérique, en association avec

- au moins un second composé, choisi parmi ceux décrits ci-dessus, possédant la propriété de solubiliser les protéines oligomériques membranaires en

les maintenant sous forme oligomérique, tout en conservant tout ou partie de leurs propriétés immunogènes,

le premier composé étant utilisé dans l'association définie ci-dessus dans des proportions telles qu'il conserve la propriété de solubiliser les protéines présentes dans ces cellules, micro-organismes (notamment les protéines responsables de la
5 réplication du génome de ces micro-organismes) ou hôtes cellulaires, tout en autorisant le maintien sous forme oligomérique de celles des protéines susceptibles d'être sous une telle forme dans ces cellules, micro-organismes ou hôtes cellulaires.

10 Une composition particulièrement préférée dans le cadre de la présente invention est telle que:

- le premier composé est constitué d'un sel de lithium ou de sodium de dodécyl sulfate,

- le second composé est le 3-[(3-cholamidopropyl)-diméthylamino]-1-propane sulfonate (ou CHAPS).
15

A titre illustratif, la quantité du premier composé, et plus particulièrement celle du SDS, représente de préférence environ 1,5 fois la quantité (en g/l) de protéines totales présentes dans l'échantillon biologique à traiter selon le procédé de lyse de l'invention.

20 Dans l'hypothèse où l'on se trouve en présence d'échantillon biologique où la concentration en protéines totales n'excède pas environ 3mg/ml, la concentration de SDS est avantageusement de l'ordre d'environ 5mg/ml.

De préférence, la quantité du second composé, et plus particulièrement du CHAPS, est au moins équivalente à celle du premier. Avantageusement, le second
25 composé est utilisé dans un rapport équimolaire avec le premier composé.

Des compositions particulièrement préférées contiennent environ 0,5% à environ 1% de chacun des deux composés SDS et CHAPS.

L'invention a également pour objet tout procédé d'obtention des compositions décrites ci-dessus de l'invention, et comprenant à titre d'exemple le mélange du
30 premier et du second composé tels que décrits ci-dessus, le cas échéant en solution aqueuse tamponnée.

L'invention vise également des trousse de réactifs (ou kits) pour la mise en oeuvre d'un procédé de lyse selon l'invention et comprenant une composition contenant en association un premier composé et un second composé tels que décrits
35 ci-dessus.

L'invention concerne également des trousse de réactifs pour la mise en oeuvre de méthodes de diagnostic ou tests de confirmation tels que décrits ci-dessus, et comprenant une composition contenant une ou plusieurs protéines

oligomériques telles qu'obtenues par mise en oeuvre du procédé de lyse de l'invention, et, le cas échéant une composition contenant en association un premier composé et un second composé tels que décrits ci-dessus.

L'invention a également pour objet l'utilisation d'une ou plusieurs protéines oligomériques telles qu'obtenues par le procédé de lyse de l'invention, pour l'obtention de médicaments et compositions vaccinales destinés respectivement au traitement et à la prévention de pathologies causées par les infections par les micro-organismes porteurs de ces protéines oligomériques.

A ce titre, l'invention a plus particulièrement pour objet des vaccins contre les différents virus du type HIV, et comprenant une ou plusieurs protéines telles qu'obtenues par mise en oeuvre du procédé de lyse de l'invention sur des virus du type HIV (notamment HIV-1 et HIV-2) ou sur des cellules infectées par ces virus.

L'invention vise plus particulièrement des compositions vaccinales comprenant le trimère de 120kDa et/ou le tétramère de 160kDa, et/ou les formes oligomériques de la protéine d'enveloppe de 36kDa susmentionnés, tels qu'obtenus par mise en oeuvre du procédé de lyse de l'invention sur des virus du type HIV-1 et/ou HIV-2, en association avec un véhicule physiologiquement acceptable.

L'invention vise également des compositions vaccinales contre les différents virus responsables de la grippe ou influenza, comprenant une composition contenant les protéines oligomériques, et plus particulièrement trimérique, de la protéine HA, en association avec un véhicule physiologiquement acceptable.

L'invention sera davantage illustrée à l'aide de la description détaillée qui suit de réalisation du procédé de lyse de l'invention pour l'obtention des protéines oligomériques de 120kDa et de 160kDa d'HIV-1 décrites ci-dessus.

25

I MATERIEL ET METHODES

1-LIGNEES CELLULAIRES ET VIRUS

1-1 CEM

Lignée lymphoblastique isolée à partir de sang périphérique d'une malade atteinte de leucémie lymphoblastique aiguë (T4+). Ces cellules proviennent de "l'American Tissue Culture Collection" (ATCC CC L 119) et portent la référence CCRS - CEM.

1-2 CEM HIV

Il s'agit de cellules CEM chroniquement infectées par l'isolat LAV BRU pour les CEM HIV-1 et par l'isolat ROD pour les CEM HIV-2.

1-3 PRODUCTION DE PARTICULES VIRALES

Les lignées productrices sont cultivées à une densité de 1 à 2.10^6 cellules/ml. Le milieu, contenant les particules virales produites, est renouvelé deux fois par jour et conservé à 4°C pendant au maximum 3 jours avant la purification.

5 1-4 PURIFICATION DES PARTICULES VIRALES

Les surnageants sont traités de la façon suivante:

- une première centrifugation permet d'éliminer les débris cellulaires pendant 30 min à 3000 g,
- le surnageant est prélevé, les particules virales en suspension sont
10 sédimentées par centrifugation pendant 1,5 h à 100 000 g,
- les particules virales sont remises en suspension dans du TNE (Tris-HCl 0,02 M à pH7,5, NaCl 0,1 M, EDTA 0,001 M) et purifiées par centrifugation isopycnique en gradient discontinu de saccharose de 20 à 59% pendant 16 h à 280 000 g.

15 Le gradient est préparé à partir de cinq solutions de saccharose à 20, 30, 38,5, 47 et 59% (poids/volume). Il s'agit d'une centrifugation à l'équilibre dans un gradient de densité discontinue. Les particules vont donc traverser les couches successives du gradient jusqu'à ce qu'elles rencontrent un milieu de densité identique à leur propre densité ($d = 1,13$).

20 Les particules virales sont recueillies au sommet de la fraction de saccharose à 38%. La fraction contenant les particules virales est diluée par deux volumes de TNE et centrifugée pour concentrer les virions pendant 3 h à 150 000g. Le culot, constitué de particules virales, est alors repris avec du TNE.

25 2-SEPARATION DES PROTEINES PAR ELECTROPHORESE EN GEL DE POLYACRYLAMIDE EN PRESENCE DE SDS

2-1 SOLUBILISATION DES PROTEINES VIRALES DANS LES CONDITIONS OPTIMISEES

Les protéines sont solubilisées dans le tampon d'échantillon suivant:

30	Tris-HCl pH 6,8	0,0625M
	DTE (dithioérythritol)	0,100M
	SDS	1%
	CHAPS	1%
	Glycérol	10%

35

2-2 CONDITIONS D'ELECTROPHORESE

Les gels de polyacrylamide sont coulés à température constante de 20°C. La séparation des protéines est effectuée en gel de polyacrylamide de 1 mm d'épaisseur composé successivement:

5 - d'un gel de résolution fait de:

Acrylamide	12,5 %
MBA (Méthylène Bisacrylamide)	0,4 %
Tris-HCl pH 8,8	0,375 M

- et d'un gel de concentration fait de:

10 Acrylamide	4 %
MBA	0,11 %
Tris-HCl pH 6,8	0,125 M

Tampons d'électrophorèse:

15 supérieur	Tris base	0,025M
	Glycine	0,192M
	SDS	0,1%
inférieur	Tris base	0,025M
	Glycine	0,192M

20

Paramètres électriques:

500 volts (V)

0,5 ampères (A)

6 watts/plaque (W)

25

600 volts.heure (V/h)

Avec ces paramètres la migration s'effectue à puissance constante et prend fin lorsque les 600 volts heures sont atteints. La migration est effectuée à température contrôlée, constante à 20°C.

30

3-ELECTROTRANSFERT SUR NITROCELLULOSE

Les protéines séparées par électrophorèse sont ensuite électrotransférées sur une feuille de nitrocellulose ou tout autre support équivalent.

35

4-REVELATION DES PROTEINES TRANSFEREES

En fin de transfert la nitrocellulose est colorée avec une solution:

rouge Ponceau à 0,025 %

acide trichloroacétique 3,5 %

Cette étape fixe les protéines sur la nitrocellulose mais permet aussi de colorer les protéines transférées et donc de vérifier la qualité du transfert. Cette coloration est labile à pH neutre.

5

5-IMMUNODETECTION

Toutes les étapes sont effectuées à température ambiante et sous agitation constante. Le rouge Ponceau est totalement éliminé par rinçage avec du PBS.

- La nitrocellulose est saturée 30 min dans une solution de lait écrémé à 1 % dans du PBS.

- Fixation du premier anticorps contenu dans du sérum dilué au 1/100^{ème} dans la solution de saturation, pendant 1 heure.

- La solution contenant le premier anticorps est éliminée et la nitrocellulose est rincée 3 fois 10 min avec une solution de Tween 20 à 0,1 % dans du PBS.

- le second anticorps est dilué au 1/1000^{ème} dans du PBS/Tween 20 et incubé pendant 1 heure.

- La nitrocellulose est alors lavée 3 fois 10 min dans du PBS/Tween puis rincée rapidement dans du PBS.

- La révélation est effectuée dans une solution de NBT/BCIP ("nitro blue tetrazolium/5 bromo-4 chloro-3 indolyl phosphate"), la réaction est arrêtée dans de l'eau distillée.

II-RESULTATS

Dans les conditions utilisant le procédé de l'invention de solubilisation des protéines virales, trois bandes correspondant aux produits de gène "env" peuvent être mises en évidence à 160, 120 et 41 kDa, laissant supposer, en première approche, qu'il s'agit respectivement:

- du précurseur, gp160;
- de la glycoprotéine externe gp120, permettant la reconnaissance du CD4;
- de la glycoprotéine transmembranaire gp41, permettant la fusion des membranes.

Dans ces conditions, toutefois, la gp41 apparaît toujours de faible intensité, alors que dans les conditions de solubilisation des protéines virales classiquement utilisées, la gp41 apparaît avec une plus grande intensité avec, en contre partie, une absence de gp160 et gp120.

Cependant les résultats obtenus avec des anticorps monoclonaux montrent que:

- la bande située à 120 kDa contient une protéine qui possède un épitope de la gp41, puisqu'un anticorps monoclonal anti-gp41 reconnaît à la fois les produits de 160 kDa et de 120 kDa,

5 - le même produit de 120 kDa est reconnu très faiblement par un anticorps monoclonal anti-gp120 qui lui-même ne reconnaît pas le produit qui devrait être son précurseur, la gp160.

Si on ne peut pas écarter l'hypothèse que l'épitope reconnu par l'anticorps monoclonal anti-gp120 ne soit pas accessible sur le précurseur gp160 non clivé, la présence d'un épitope de gp41 sur la gp120 ne peut, en revanche, pas être
10 expliquée puisque ces deux protéines sont codées par des régions différentes du génome viral et qu'elles ne possèdent ni homologie de séquence ni réactivité immunologique croisée.

Par conséquent, tous les épitopes reconnus par ces anticorps monoclonaux anti-gp41 sont présents sur les produits de 120 à 160 kDa et les épitopes de la
15 gp120 ne sont jamais détectés sur le produit de 160 kDa. Ceci suggère que les deux bandes mises en évidence en "western blot" à 120 et 160 kDa correspondent à des formes oligomériques de la gp41.

Cependant, les anticorps monoclonaux anti gp120 reconnaissent également un produit de 120 kDa. Il faut donc supposer que la bande mise en évidence par
20 immunodétection avec un sérum positif, correspond à la détection de deux produits du gène "env", à savoir une forme multimérique de la gp41 associée à la glycoprotéine externe gp120. Ceci est compatible avec les résultats obtenus en "western blot" puisque, l'immunodétection effectuée avec les anticorps monoclonaux anti gp120 donne dans la région de 120 kDa une bande d'environ
25 1 mm, alors que sur la même membrane, un sérum positif donne dans cette région un signal beaucoup plus large de 3 à 4 mm environ. De plus, cette bande reconnue par l'anticorps anti gp 120 est non seulement plus fine mais également légèrement plus haute que la bande reconnue par l'anticorps monoclonal anti-gp41.

Ainsi le produit de 160 kDa mis en évidence sur les "western blots" préparés
30 à partir de lysats de virus correspond-il à un tétramère de gp41 et la bande de 120 kDa correspond-elle à la fois à la gp120 et à un trimère de la gp41.

Le précurseur codé par le gène env (la gp160) ne serait pas présent dans la particule virale sous sa forme non clivée. Ce point est en accord avec les résultats de Pinter et col. (1989) qui, grâce à un anticorps monoclonal anti-gp120, mettent
35 en évidence la présence de gp160 et de gp120 dans un lysat de cellules infectées, alors que le même anticorps ne reconnaît que la gp120 dans les particules virales.

L'addition de CHAPS ou 3-[(3-cholamidoproyl)-diméthylamino-1-propane sulfonate] au tampon de dissociation des particules virales apparaît directement

responsable du maintien des structures oligomériques des glycoprotéines de l'enveloppe virale. Le CHAPS est un détergent "zwitterionique" dont la structure est proche de celle du cholestérol et qui possède des propriétés proches de celles d'autres détergents ioniques, comme les cholates et deoxycholates. Le CHAPS permet une bonne solubilisation des protéines membranaires et empêche la formation d'aggrégats protéiques. Il a permis d'isoler des récepteurs membranaires sans en altérer les propriétés (affinités, spécificités), alors que ces récepteurs perdent leur propriété lorsqu'ils sont extraits avec d'autres détergents [Simonds et col., 1980; Sladeczek et col., 1984; Brose et col., 1992].

Dans le cas de HIV, l'effet stabilisateur du CHAPS sur la structure quaternaire du tétramère dépend de la concentration en CHAPS au moment de la dissociation des particules virales. Si le CHAPS est ajouté à des particules virales déjà dissociées par action du SDS, il ne permet pas la réassociation des monomères. Pour HIV, l'interaction gp41/CHAPS semble stabiliser la conformation oligomérique de la gp41, ce qui lui permet d'être parfaitement reconnue par les anticorps. Sans CHAPS et à 1% de SDS, les formes oligomériques sont progressivement dissociées, la dissociation étant accélérée par le traitement à 95°C. De plus, il a été montré que la concentration maximum de SDS tolérée par le tétramère de gp41 est de l'ordre de 0,1 à 0,15 %. Au-delà le tétramère est dissocié. Il semble cependant que les tétramères puissent résister à des concentrations plus élevées en SDS mais pendant un laps de temps très court (environ 5 min) [Pinter et col., 1989]. Ces résultats renforcent les observations effectuées au laboratoire avec la mise en évidence de la perte de réactivité antigénique au niveau des formes oligomériques de la gp41 par traitement de échantillons à 95°C en présence de 1% de SDS.

On peut donc supposer que lors du traitement de la particule virale par le tampon de solubilisation contenant à la fois du CHAPS et du SDS:

- le CHAPS prend la place du cholestérol membranaire avec une affinité pour les aminoacides hydrophobes impliqués dans l'interaction avec le cholestérol plus importante que celle, moins spécifique, du SDS pour ces mêmes aminoacides hydrophobes transmembranaires,

- tandis que le SDS prend la place des phospholipides et glycolipides membranaires,

- l'association SDS-CHAPS tendant à reconstituer l'environnement nécessaire au maintien des structures oligomériques des glycoprotéines transmembranaires.

Cependant, un excès de SDS ou le chauffage prolongé au moment de la solubilisation déplacent l'interaction en faveur du SDS qui prend alors, de façon irréversible, la place du CHAPS.

III TEST D'IMMUNOGENICITE CHEZ LA SOURIS

- Obtention de la préparation vaccinale

5

Le virus grippal purifié par ultracentrifugation sur gradient de saccharose est remis en suspension en tampon phosphate (PBS) à pH 7,4 à la concentration de 3 mg de protéines totales/ml (dosage protéique selon Bradford, 1976).

Après sonication, le virus est traité pendant 18h à 37°C par un égal volume
10 d'une solution de détergents contenant 1 % de SDS et 1 % de CHAPS en tampon PBS à pH 7,4, DTE (dithioerythritol) 0,02 M. On recherche l'absence de virus résiduel par inoculation de 0,2 ml de la préparation virale non diluée ou diluée à 1/10 dans la cavité allantoïque d'oeufs de poule embryonnés de 10 jours; en cas d'activité infectieuse résiduelle, on peut effectuer une étape supplémentaire
15 d'inactivation par traitement au formaldéhyde à 0,01 % final pendant 24 h à température ambiante.

- Protocole d'immunisation

20 Des souris BALB/c (IFFA-CREDO France) âgées de 6 semaines sont immunisées par voie sous-cutanée, sous un volume de 0,5 ml, avec les doses de 0-0,1-1-10 et 100µg de protéines totales de la préparation virale inactivée obtenue précédemment; ces doses sont préparées par dilution de la préparation dans du tampon PBS pH 7,4. Elles sont administrées sans adjuvant. Chaque groupe
25 expérimental est constitué de 10 animaux recevant chacun une dose identique d'antigène.

Deux schémas d'immunisation sont effectués parallèlement qui comportent ou non une injection de rappel: 28 jours après immunisation, les groupes d'animaux recevant une seule injection sont saignés, ceux qui subissent une injection de rappel
30 reçoivent une injection de même dose que lors de la primo-immunisation et sont ensuite saignés 15 jours après le rappel. Les prélèvements de sang sont effectués à la carotide, sous anesthésie des souris à l'éther.

- Analyse des sérums

35 Les sérums sont analysés pour leur contenu en anticorps inhibant l'activité hémagglutinante du virus grippal (anticorps IHA). (il est admis qu'ils ont, chez l'homme, une signification protectrice vis-à-vis de la souche d'immunisation pour des taux d'ordre de 40-80).

Les sérums sont préalablement débarrassés de leurs inhibiteurs non spécifiques par traitement à la neuraminidase de choléra (Receptor Destroying Enzyme, RDE), suivi si nécessaire par un traitement au métapériodate de potassium.

- 5 La réaction d'inhibition d'hémagglutination (Palmer et al., 1975) met en présence à volume égal (sous 50 μ l, en tampon PBS) des dilutions de raison 2 des sérums traités, le virus grippal dilué de façon à contenir 4 unités hémagglutinantes, et des globules rouges de poule à 0,5 %. Le titre du sérum en anticorps IHA est donné par l'inverse de la dernière dilution qui inhibe l'activité hémagglutinante du
10 virus.

BIBLIOGRAPHIE

- 15 - Bradford (1976). Anal. Biochem. 72, 248-354.
- Brose, N., Petrenko, A.G., Südhof, T.C. et Jahn, R. (1992). "Synaptogamin: A calcium sensor on the synaptic vesicle surface". Science 256, 1021-1025.
- 20 - Copeland, C.S., Doms, R.W., Bolzau, E.M., Webster, R.G. et Helenius, A. (1986). "Assembly of influenza hemagglutinin trimers and its role in intracellular transport". J. Cell Biol. 103, 1179-1191.
- 25 - Doms, R.W. et Helenius, A. (1986). "Quaternary structure of influenza virus hemagglutinin after acidic treatment". 60, 833-839.
- Einfeld, D. et Hunter, E. (1988). "Oligomeric structure of a prototype retrovirus glycoprotein". Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 8688-8692.
- 30 - Evans, L.A. et Levy, J.A. (1989). "Characteristics of HIV infection and pathogenesis". Biochim. Biophys. Acta 989, 237-254.
- Gething, M.J., McCammon, K. et Sambrook, J. (1986). "Expression of
35 wild-type and mutant forms of influenza hemagglutinin: the role of folding in intracellular transport". Cell 46, 939-950.

- Kreis, T.E. et Lodish, H.F. (1986). "Oligomerization is essential for transport of vesicular stomatitis viral glycoprotein to the cell surface". *Cell* 46, 929- 937.
- 5 - Pinter, A. et Fleissner, E. (1979). "Structural studies of retroviruses: characterization of oligomeric complexes of murine and feline leukemia virus envelope and core components formed upon cross-linking". *J. Virol.* 30, 157-165.
- 10 - Palmer et al. (1975). "Haemagglutination-inhibition test". *Advanced laboratory technicals for immunological diagnostic* (Ed. Welfare P.H.S., Atlanta), Immunology Ser. N° 6, Procedural guide Part 2, 25-62.)
- 15 - Pinter, A., Honnen, W.J., Tilley, S.A., Bona, C., Zaghouani, H., Gorny, M.K. et Zolla-Pazner, S. (1989). "Oligomeric structure of gp41, the transmembrane protein of human immunodeficiency virus type 1". 63, 2674-2679.
- 20 - Racevskis, J. et Sarkar, N.H. (1980). "Murine mammary tumor virus structural protein interactions: formation of oligomeric complexes with cleavable cross-linking agents". *J. Virol.* 35, 937-948.
- 25 - Simonds, W., Koski, G., Streaty, R.A., Hjelmeland, L.M. et Klee, W.A. (1980). "Solubilisation of active opiate receptors". *Proc. Natl. Sci. Acad. USA* 77, 4623-4627.
- 30 - Sladeczek, F., Bockaert, J. et Rouot, B. (1984). "Solubilization of a adrenoceptor with a zwitterionic detergent: preservation of agonist binding and its sensitivity to GTP". *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 1116-1121.
- 35 - Takemoto, L.J., Fox, C.S., Jensen, F.C., Elder, J.H. et Lerner, R.A. (1978). "Nearest neighbor interactions of the major RNA tumor virus glycoprotein on murine cell surfaces". *Proc. Natl. Sci. Acad. USA* 75, 3644-3648.
- Varghese, J.N., Lavef, W.G. et Colman, P.M. (1983). "Structure of the influenza virus glycoprotein antigen neuraminidase at 2,9 A resolution". *Nature* 303, 35-40.

- Wong-Staal, F. et Haseltine, W.A. (1992). "Regulatory genes of Human Immunodeficiency Viruses". in Molecular Genetic Medicine, Vol.2, Friedman, T. ed., PP 189-219.

REVENDICATIONS

5

1. Procédé de lyse de cellules ou de micro-organismes, tels que les virus, ou d'hôtes cellulaires infectés par ces micro-organismes, aux génomes modifiés ou non, notamment aux fins d'obtention et, le cas échéant de purification des protéines à localisation membranaire chez ces cellules, micro-organismes ou hôtes
10 cellulaires, ce procédé permettant de maintenir sous forme oligomérique celles des protéines susceptibles d'être présentes sous une telle forme dans les cellules, micro-organismes ou hôtes cellulaires susmentionnés, tout en détruisant le pouvoir infectieux de ces micro-organismes, lequel procédé est caractérisé en ce qu'il comprend une étape de traitement de ces cellules, micro-organismes ou hôtes
15 cellulaires à l'aide d'une composition contenant une association d'au moins deux molécules différentes (désignées respectivement par premier et second composés) au caractère amphipathique, chacune comprenant une partie hydrophobe et une partie hydrophile.

20

2. Procédé de lyse selon la revendication 1, caractérisé en ce que l'une au moins des deux molécules, à savoir le premier composé, possède la propriété, lorsqu'il est utilisé en dehors de l'association avec le second composé, de solubiliser les protéines présentes dans ces cellules, micro-organismes ou hôtes cellulaires, et de dissocier les protéines qui sont sous forme oligomérique, ce
25 composé étant utilisé dans l'association définie dans la revendication 1 avec le second composé dans des proportions telles qu'il conserve la propriété de solubiliser les protéines présentes dans ces cellules, micro-organismes ou hôtes cellulaires tout en autorisant le maintien sous forme oligomérique de celles des protéines susceptibles d'être sous une telle forme dans ces cellules, micro-
30 organismes ou hôtes cellulaires.

3. Procédé de lyse selon la revendication 2, caractérisé en ce que le premier composé, est constitué d'une ou plusieurs chaînes hydrocarbonées, hydrophobes saturées ou insaturées, ramifiées ou non, et d'une tête polaire reliant entre elles ou
35 non ces chaînes hydrophobes.

4. Procédé de lyse selon la revendication 3, caractérisé en ce que le premier composé est choisi parmi les composés répondant à la formule suivante:

$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_n\text{-R}$, dans laquelle:

- R représente un groupe sulfate, phosphate, ou un halogène, notamment le chlore ou le brome,
- n est supérieur ou égal à 4, et de préférence compris entre 10 et 18.

5. Procédé de lyse selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que le second composé utilisé dans l'association définie dans la revendication 1, possède la propriété de solubiliser les protéines oligomériques membranaires en les maintenant sous forme oligomérique, tout en conservant tout ou partie de leurs propriétés immunogènes.

6. Procédé de lyse selon la revendication 5, caractérisé en ce que le second composé a pour structure de base hydrophobe le noyau gonane, constitué de 4 noyaux cycliques A, B, C et D, à 17 atomes de carbone, constituant la structure de base du cholestérol, portant ou non des groupements hydrocarbonés branchés en 10 ou en 13, ainsi que des groupements hydrophiles sur certains des 17 atomes de carbone, en alpha ou bêta, principalement en 3, 7, 12, estérifiés ou non, cette structure de base étant associée ou non à une autre tête polaire branchée sur le noyau cyclique D en 15, 16 ou 17, directement ou non par l'intermédiaire d'une chaîne hydrocarbonée.

7. Procédé de lyse selon l'une des revendications 1 à 6, caractérisé en ce que le premier composé est le sodium dodécyl sulfate (ou SDS) et le second composé est le 3-[(3-cholamidopropyl)-diméthylamino-1-propane sulfonate] (ou CHAPS).

8. Procédé de lyse selon l'une des revendications 1 à 7, caractérisé en ce qu'il est appliqué sur des cellules humaines, animales ou végétales, ou sur des micro-organismes ou des hôtes cellulaires infectés par ces micro-organismes, notamment par des virus humains, animaux ou végétaux, présentant des protéines, notamment des glycoprotéines d'enveloppe, susceptibles d'être sous forme oligomérique et, le cas échéant, responsables de la fusion des membranes virus-hôte lors de l'infection.

9. Procédé de lyse selon l'une des revendications 1 à 8, caractérisé en ce qu'il est appliqué sur des rétrovirus humains du type HIV-1, HIV-2 et HTLV-I,

HTLV-II, les myxovirus, notamment les virus de l'influenza, les paramyxovirus, notamment le virus des oreillons et le virus de la rougeole.

10. Procédé de lyse selon l'une des revendications 1 à 9, caractérisé en ce
5 qu'il est appliqué aux différents types de virus responsables du SIDA, HIV-1 ou HIV-2 ou un mélange de ces derniers, en vue de la séparation, pour ce qui concerne HIV-1, d'une part la protéine d'enveloppe transmembranaire de HIV-1, de 41kDa connue sous le nom de GP41 (responsable de la fusion des membranes avec les cellules cibles lors de l'infection), sous forme oligomérique, c'est à dire
10 trimérique de 120kDa et plus particulièrement tétramérique de 160 kDa, et d'autre part les autres protéines entrant dans la composition du virion, notamment les produits des gènes viraux "gag", "pol" et "env", y compris la gp120 (autre produit de clivage du précurseur de la protéine d'enveloppe gp160 et qui est responsable de la reconnaissance de la cellule cible CD4 positive) sous forme monomérique, et,
15 pour ce qui concerne HIV-2, d'une part les formes oligomériques de la protéine d'enveloppe de 36kDa connues sous le nom de gp36 et, d'autre part les autres protéines constitutives du virion de façon analogue à celles d'HIV-1.

11. Procédé de lyse selon l'une des revendications 1 à 9, caractérisé en ce
20 qu'il est appliqué aux différents types de myxovirus responsables de la grippe ou influenza, avec possibilité de séparer, d'une part la protéine d'enveloppe HA aux propriétés hémagglutinantes sous forme oligomérique et plus particulièrement trimérique et, d'autre part, les autres protéines entrant dans la composition du virion.

25

12. Procédé d'obtention de protéines sous leur forme oligomérique telle qu'existante dans la membrane cellulaire ou dans la membrane des micro-organismes, caractérisé en ce qu'il comprend une étape de lyse des cellules, des micro-organismes, notamment de virus, ou des hôtes cellulaires infectés par ces
30 micro-organismes, suivant le procédé selon l'une des revendications 1 à 11, le cas échéant suivie d'une étape de séparation proprement dite des protéines obtenues lors de l'étape précédente, notamment par électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de dodécyl sulfate de sodium par exemple, permettant la séparation des protéines en fonction de leur masse moléculaire, les protéines sous forme
35 oligomérique restant associées sous une telle forme, cette dernière étape ou l'étape de lyse précédente étant elles-mêmes le cas échéant suivie d'une étape de purification de la protéine ou des protéines ainsi obtenues.

13. Protéines oligomériques telles qu'obtenues par mise en oeuvre d'un procédé selon l'une des revendications 1 à 12.

14. composition de protéines oligomériques telles selon la revendication 13, comprenant le trimère de la protéine d'enveloppe transmembranaire de HIV-1 de 41kDa (ou gp41), à savoir le trimère de 120kDa décrit ci-dessus, et/ou le tétramère de cette gp41, à savoir le tétramère de 160kDa, et/ou une ou plusieurs formes oligomériques de la gp36 d'HIV-2.

15. 15. Composition de protéines oligomériques selon la revendication 13, comprenant la protéine d'enveloppe HA aux propriétés hémagglutinantes sous forme oligomérique et plus particulièrement trimérique, des myxovirus responsables de la grippe ou influenza.

16. 16. Méthode de diagnostic in vitro de pathologies causées par l'infection d'individus (homme ou animal) par des micro-organismes, notamment par les virus du type HIV, cette méthode comprenant une étape de détection des anticorps reconnus spécifiquement par les protéines oligomériques telles qu'obtenues par le procédé selon l'une des revendications 1 à 13, notamment par les protéines selon la revendication 14, ces anticorps étant susceptibles d'être présents dans des échantillons biologiques, notamment dans du sérum, provenant d'individus eux-mêmes susceptibles d'être infectés par les micro-organismes en question.

17. 17. Composition vaccinnante contre les différents virus du type HIV, comprenant une composition selon la revendication 14, en association avec un véhicule physiologiquement acceptable.

18. 18. Composition vaccinnante contre les différents virus responsables de la grippe ou influenza, comprenant une composition selon la revendication 15, en association avec un véhicule physiologiquement acceptable.

19. 19. Composition caractérisée en ce qu'elle comprend:

- au moins un premier composé susceptible de solubiliser les protéines présentes dans des cellules, micro-organismes, notamment des virus, ou hôtes cellulaires infectés par ces micro-organismes, et de dissocier (lorsqu'il est utilisé seul ou en très large excès par rapport au second composé) les protéines qui sont sous forme oligomérique, en association avec

- au moins un second composé possédant la propriété de solubiliser les protéines oligomériques membranaires en les maintenant sous forme oligomérique, tout en conservant leurs propriétés immunogènes,

le premier composé étant utilisé dans l'association définie ci-dessus avec dans
5 des proportions telles qu'il conserve la propriété de solubiliser les protéines présentes dans ces cellules, micro-organismes ou hôtes cellulaires, tout en autorisant le maintien sous forme oligomérique de celles des protéines susceptibles d'être sous une telle forme dans ces cellules, micro-organismes ou hôtes cellulaires.

10

20. Composition selon la revendication 19, caractérisée en ce que le premier composé est le sodium dodécyl sulfate (ou SDS) et le second composé est le 3-[(3-cholamidopropyl)-diméthylamino-1-propane sulfonate] (ou CHAPS).

15 21. Composition selon la revendication 19 ou 20, caractérisée en ce que la quantité du premier composé, et plus particulièrement celle du SDS, représente de préférence environ 1,5 fois la quantité (en g/l) de protéines totales présentes dans l'échantillon biologique à traiter selon le procédé de lyse défini dans l'une des revendications 1 à 13.

20

22. Composition selon l'une des revendications 19 à 21, caractérisée en ce que la quantité du second composé, et plus particulièrement du CHAPS, est au moins équivalente à celle du premier.

25 23. Composition selon l'une des revendications 19 à 22, caractérisée en ce que le SDS et le CHAPS sont utilisés dans un rapport équipondéral, et contient de préférence environ 0,5% à environ 1% de chacun de ces deux composés.

30 24. Trousses de réactifs (ou kits) pour la mise en oeuvre d'un procédé selon l'une des revendications 1 à 13 et comprenant une composition selon l'une des revendications 19 à 23.

35 25. Trousses de réactifs pour la mise en oeuvre d'une méthode de diagnostic selon la revendication 16, comprenant une composition contenant une ou plusieurs protéines oligomériques telles qu'obtenues par le procédé selon l'une des revendications 1 à 13, notamment une composition selon la revendication 14, et le cas échéant une composition selon l'une des revendications 19 à 23.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/FR 93/00654

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl.⁵ C12N1/06; C07K3/08; C07K15/00; C07K13/00
A61K39/21; A61K39/145; G01N33/569

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl.⁵ C12N; C07K; A61K; G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	EP,A,0295859 (BUNGE (AUSTRALIA) PROPRIETARY LIMITED) 21 December 1988 see column 4, line 21 - line 43 see column 7, line 8 - line 26; claims ---	1-24
Y	WO,A,9106646 (TRITON BIOSCIENCES INC.) 16 May 1991 see page 5, line 15 - line 22; claims ---	1-24
Y	EP,A,0382875 (MATUO) 22 August 1990 see the whole document ---	1-24
P,Y	DE,A,300690 (HUMBOLDT-UNIVERSITÄT ZU BERLIN) 02 July 1992 see the whole document ---	1-24
A	EP,A,0334278 (W.BREDT ET AL.) 27 september 1989 see the whole document ---	1-9 ./...

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

07 October 1993 (07.10.93)

Date of mailing of the international search report

14 October 1993 (14.10.93)

Name and mailing address of the ISA/

EUROPEAN PATENT OFFICE
Facsimile No.

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/FR 93/00654

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO,A,9013314 (INSTITUT PASTEUR) 15 November 1990 see abstract; claims ---	11-18,24
A	EP,A,0321606 (IMMUNO AKTIENGESELLSCHAFT FÜR CHEMISCHE-MEDIZINISCHE PRODUKTE) 28 June 1989 ---	
A	US,A,4752473 (D.P. NAYAK & M.A. JABBAR) 21 June 1988 see column 5, line 36 - line 45; claims ---	15,18
A	EP,A,0366239 (SMITHKLINE BEECHAM CORPORATION) 02 May 1990 see claims ---	1,15,18
A	WO,A,9114449 (INSTITUT PASTEUR) 03 October 1991 see abstract; claims -----	13-14,17

**ANNEX TO THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT
ON INTERNATIONAL PATENT APPLICATION NO.**

FR 9300654
SA 75842

This annex lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report.
The members are as contained in the European Patent Office EDP file on
The European Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

07/10/93

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP-A-0295859	21-12-88	AU-A- 1763288 JP-A- 1047389 US-A- 4992531	15-12-88 21-02-89 12-02-91
WO-A-9106646	16-05-91	US-A- 5215963 AU-A- 7039491 AU-B- 640480 AU-A- 7740691 CA-A- 2067766 CA-A- 2069965 EP-A- 0497866 EP-A- 0524173 JP-T- 5505097 WO-A- 9106647	01-06-93 31-05-91 26-08-93 31-05-91 25-04-91 25-04-91 12-08-92 27-01-93 05-08-93 16-05-91
EP-A-0382875	22-08-90	JP-A- 1047435	21-02-89
DD-A-300690		None	
EP-A-0334278	27-09-89	DE-A- 3809796 AU-A- 3158189 JP-A- 2036193 US-A- 5084561	05-10-89 28-09-89 06-02-90 28-01-92
WO-A-9013314	15-11-90	FR-A- 2646854 US-A- 5208321 EP-A- 0424519 JP-T- 3506042 CA-A- 2032505	16-11-90 04-05-93 02-05-91 26-12-91 13-11-90
EP-A-0321606	28-06-89	JP-A- 2000798	05-01-90
US-A-4752473	21-06-88	None	
EP-A-0366239	02-05-90	AU-B- 640348 AU-A- 4022589 JP-A- 3130087	26-08-93 08-03-90 03-06-91
WO-A-9114449	03-10-91	AU-A- 7498991 EP-A- 0472706	21-10-91 04-03-92

FR 9300654
SA 75842

07/10/93

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO-A-9114449		JP-A- 3271233	03-12-91
		JP-T- 4506220	29-10-92

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

PCT/FR 93/00654

Demande Internationale No

I. CLASSEMENT DE L'INVENTION (si plusieurs symboles de classification sont applicables, les indiquer tous) ⁷		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
CIB 5 C12N1/06; A61K39/21;	C07K3/08; A61K39/145;	C07K15/00; G01N33/569
C07K13/00		
II. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE		
Documentation minimale consultée ⁸		
Système de classification	Symboles de classification	
CIB 5	C12N ; C07K ; A61K ; G01N	
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où de tels documents font partie des domaines sur lesquels la recherche a porté ⁹		
III. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS ¹⁰		
Catégorie ^o	Identification des documents cités, avec indication, si nécessaire, ¹² des passages pertinents ¹³	No. des revendications visées ¹⁴
Y	EP,A,0 295 859 (BUNGE (AUSTRALIA) PROPRIETARY LIMITED) 21 Décembre 1988 voir colonne 4, ligne 21 - ligne 43 voir colonne 7, ligne 8 - ligne 26; revendications ---	1-24
Y	WO,A,9 106 646 (TRITON BIOSCIENCES INC.) 16 Mai 1991 voir page 5, ligne 15 - ligne 22; revendications ---	1-24
Y	EP,A,0 382 875 (MATUO) 22 Août 1990 voir le document en entier ---	1-24
	-/--	
^o Catégories spéciales de documents cités: ¹¹ "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée) "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée "T" document ultérieur publié postérieurement à la date de dépôt international ou à la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier. "A" document qui fait partie de la même famille de brevets		
IV. CERTIFICATION		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée		Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale
07 OCTOBRE 1993		14.10.93
Administration chargée de la recherche internationale OFFICE EUROPEEN DES BREVETS		Signature du fonctionnaire autorisé BEVAN S.R.

III. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS ¹⁴		(SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDIQUES SUR LA DEUXIEME FEUILLE)
Catégorie °	Identification des documents cités, ¹⁶ avec indication, si nécessaire des passages pertinents ¹⁷	No. des revendications visées ¹⁸
P,Y	DD,A,300 690 (HUMBOLDT-UNIVERSITÄT ZU BERLIN) 2 Juillet 1992 voir le document en entier ----	1-24
A	EP,A,0 334 278 (W. BREDT ET AL.) 27 Septembre 1989 voir le document en entier ----	1-9
A	WO,A,9 013 314 (INSTITUT PASTEUR) 15 Novembre 1990 voir abrégé; revendications ----	11-18,24
A	EP,A,0 321 606 (IMMUNO AKTIENGESELLSCHAFT FÜR CHEMISCHE-MEDIZINISCHE PRODUKTE) 28 Juin 1989 ----	
A	US,A,4 752 473 (D.P. NAYAK & M.A. JABBAR) 21 Juin 1988 voir colonne 5, ligne 36 - ligne 45; revendications ----	15,18
A	EP,A,0 366 239 (SMITHKLINE BEECHAM CORPORATION) 2 Mai 1990 voir revendications ----	1,15,18
A	WO,A,9 114 449 (INSTITUT PASTEUR) 3 Octobre 1991 voir abrégé; revendications -----	13-14,17

**ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE
RELATIF A LA DEMANDE INTERNATIONALE NO.**

FR 9300654
SA 75842

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche internationale visé ci-dessus.
Lesdits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du
Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets.

07/10/93

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
EP-A-0295859	21-12-88	AU-A- 1763288 JP-A- 1047389 US-A- 4992531	15-12-88 21-02-89 12-02-91
WO-A-9106646	16-05-91	US-A- 5215963 AU-A- 7039491 AU-B- 640480 AU-A- 7740691 CA-A- 2067766 CA-A- 2069965 EP-A- 0497866 EP-A- 0524173 JP-T- 5505097 WO-A- 9106647	01-06-93 31-05-91 26-08-93 31-05-91 25-04-91 25-04-91 12-08-92 27-01-93 05-08-93 16-05-91
EP-A-0382875	22-08-90	JP-A- 1047435	21-02-89
DD-A-300690		Aucun	
EP-A-0334278	27-09-89	DE-A- 3809796 AU-A- 3158189 JP-A- 2036193 US-A- 5084561	05-10-89 28-09-89 06-02-90 28-01-92
WO-A-9013314	15-11-90	FR-A- 2646854 US-A- 5208321 EP-A- 0424519 JP-T- 3506042 CA-A- 2032505	16-11-90 04-05-93 02-05-91 26-12-91 13-11-90
EP-A-0321606	28-06-89	JP-A- 2000798	05-01-90
US-A-4752473	21-06-88	Aucun	
EP-A-0366239	02-05-90	AU-B- 640348 AU-A- 4022589 JP-A- 3130087	26-08-93 08-03-90 03-06-91
WO-A-9114449	03-10-91	AU-A- 7498991 EP-A- 0472706	21-10-91 04-03-92

EPO FORM P0072

FR 9300654
SA 75842

07/10/93

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO-A-9114449		JP-A- 3271233	03-12-91
		JP-T- 4506220	29-10-92

Translation

#6
IDS

PTO 03-0175

CY=WO DATE=19940106 KIND=A1
PN=94-00557

METHOD FOR PREPARING MEMBRANE PROTEINS, AND PRESERVING THEIR OLIGOMERIC
STRUCTURES UNDER DENATURING CONDITIONS, AND USES OF SAID PROTEINS IN
DIAGNOSES, AND VACCINATION

[Procédé d'obtention de protéines membranaires, permettant le maintien
des structures oligomériques de ces protéines en conditions déaturantes,
et utilisation de ces protéines dans un but de diagnostic ou de
vaccination.]

Jean-Jacques Madjar, et al.

UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE
Washington, D.C. October 2002

Translated by: FLS, Inc.

PUBLICATION COUNTRY (10): WO
 DOCUMENT NUMBER (11): WO 94/00557
 DOCUMENT KIND (12): A1
 (13): Published Application
 PUBLICATION DATE (43): 19940106
 PUBLICATION DATE (45):
 APPLICATION NUMBER (21): PCT/FR93/00654
 APPLICATION DATE (22): 19930629
 ADDITION TO (61):
 INTERNATIONAL CLASSIFICATION (51):
 C12N 1/06, C07K 3/08, 15/00 C07K 13/00, A61K 39/21, 39/145, G01N
 33/569
 DOMESTIC CLASSIFICATION (52):
 PRIORITY COUNTRY (33): FR
 PRIORITY NUMBER (31): 92/08051
 PRIORITY DATE (32): 19920630
 INVENTORS (72): Jean-Jacques Madjar and Herv Poly
 APPLICANT (71): Centre national de la recherche
 scientifique, FR
 TITLE (54):
 METHOD FOR PREPARING MEMBRANE PROTEINS, AND PRESERVING THEIR OLIGOMERIC
 STRUCTURES UNDER DENATURING CONDITIONS, AND USES OF SAID PROTEINS IN
 DIAGNOSES, AND VACCINATION
 FOREIGN TITLE [54A]:
 Procéde d'obtention de proténes membranaires, permettant le
 maintien des structures oligomériques de ces proténes en conditions
 déaturantes, et utilisation de ces proténes dans un but de
 diagnostic ou de vaccination dans un but de diagnostic ou de
 vaccination

The present invention pertains to a process for obtaining oligomeric proteins, and in particular the ones with a membrane location in the cells, microorganisms (in particular viruses), or host cells infected by these microorganisms, this process enabling keeping these proteins in the oligomeric form.

The invention also pertains to the uses of these oligomeric proteins thus obtained, in particular for implementing methods for diagnosing pathologies caused by the infection of an individual by microorganisms carrying such proteins, or again in the framework of vaccination against this type of infection.

Numerous proteins with membrane locations in the cells, or microorganisms are in oligomeric form. To illustrate this, the viruses responsible for the acquired immune deficiency syndrome (AIDS) be mentioned among the microorganisms susceptible of having membrane oligomeric proteins.

In the case of searching for an HIV infection, a serology found positive at screening, generally through ELISA type diagnosis tests, does not enable, by itself, to confirm contamination by the virus. Two competing methods are used for confirmation. The first, reputed to be the most effective, is known by the abbreviation RIPA ("radio-immune precipitation assay") because it uses the immuno-precipitation of viral proteins, marked beforehand

*Numbers in the margin indicate pagination in the foreign text.

with a radioactive isotope (here ^{35}S -cysteine). The second method is designated by the expression "western blot". In practice, it uses immuno-detection by the antibodies of the serum to be analyzed, the viral proteins separated by electrophoresis, and transferred to a sheet of nitrocellulose, or any other equivalent medium. In both cases, the virus must be cultivated as an antigen source, but RIPA can only be done in a specialized laboratory, which has the equipment, and structure enabling the culture, and marking of the virus in controlled conditions at its disposal, while the "western blot" can be used in any laboratory which is provided with the membrane carrying the viral antigenic proteins already separated by electrophoresis.

The glycoprotein of the HIV-1 envelop is coded by the "env" /2 gene, and the translation of the corresponding mRNA gives a glycosylated protein, gp160, in the form of a precursor whose molecular mass is 160 kDa. gp160 is cleaved inside the cell to give, in the area of the cytoplasmic membrane during the budding of the virus being formed, on the one hand, gp120 that is found outside the cell, and the virus, on the other one, gp41, transmembrane part of the glycoprotein, which corresponds to the precursor's carboxy-terminal end. Once the viral particle is released, the gp41, only transmembrane protein, will have its carboxy-terminal end turned toward the inside of the virus, and its amino-terminal end will protrude outside, maintaining itself

associated to the gp120 in a non covalent manner. The gp120 behaves like a bi-functional molecule. It is attached to the gp41 by its amino-terminal end, while its carboxy-terminal end recognizes the region situated between the 32, and 47 residues of the CD4 molecule (specific to auxiliary T4 lymphocytes, macrophages...). The linkage of gp120 to CD4 allows exposing the target cell's membrane to gp41's amino-terminal hydrophobe portion, which seems to induce the mechanism fusing the membranes of the virus, and the cells, this fusion being at the origin of the penetration of the virion into the target cell during infection (for the publications, see Evans, and Levy 1989; Wong-Staal, and Haseltine, 1992).

This process of recognition of the viral receptor, followed by the fusion of the membranes by means of the interaction of the fusion protein's amino-terminal end with the target cell's membrane, is not a mechanism restricted to HIV. It is possible, thanks to the presence in the oligomeric form of the virus' trans-membrane glycoproteins. Bridges with chemical agents have enabled revealing trimers in the area of the glycoproteins of the MuLV envelop (Takemoto et col., 1978; Pinter and Fleissner, 1979), of MuMTV (Racevskis and Sarkar, 1980). It has also been shown that the RSV envelop's protein forms oligomers found in the infected cells, and the viral particles (Einfeld, and Hunter, 1988). The influenza virus also expresses a hemagglutinin in the trimeric form

(Dons and Helenius, 1986). In this last case, the multimeric form is necessary for the intracellular transport of the protein (Copeland et col., 1986; Gething et col., 1986). The influenza also expresses a neuraminidase at its surface in the form of a tetramer (Varghese et col., 1983). The vesicular stomatitis virus (VSV) also expresses a glycoprotein in the oligomeric form, and in this case, the association of the monomers is indispensable for the transport of the endoplasmic reticulum protein toward the Golgi apparatus (Kreis and Lodish, 1986). The oligomerization of the trans-membrane glycoprotein is also found in the paramyxoviruses, such as Sendai virus, and in the mumps virus.

/3

The authors of the present invention have revealed the fact that it is possible, in well defined conditions, and even in denaturant conditions, to isolate the oligomeric forms of this gp41 of HIV-1 (and more especially a 120kDa trimer, and a 160kDa tetramer), which are therefore different proteins of the above mentioned gp120, and gp160.

The oligomeric structures of the proteins, and more especially the membrane proteins, represent the molecular forms characteristic of certain categories of cells, microorganisms, or host cells infected by these microorganisms, and consequently, are particularly advantageous components to use:

- in the framework of screening for pathologies caused by the infection of an individual with these microorganisms (in particular, by the detection of antibodies directed against these proteins in the serums of the individuals infected), and more specifically in the framework of a test for confirming the conventional methods for screening for these infections,

- of also in the framework of vaccination intended to prevent such infections.

However, the methods existing currently for isolating proteins from cells, or microorganisms, especially in order to obtain them, destroy these oligomeric structures to create monomeric forms, whose use does not always allow making a certain conclusion as to an infection, nor to obtain an effective vaccination against these infections.

However, the precise goal of the present invention is to provide a process for isolating proteins from cells, microorganisms, or host cells infected by these microorganisms, which has the advantage of enabling one to maintain in the oligomeric form those proteins existing in such a form in these cells, microorganisms, or host cells infected by these microorganisms.

Another purpose of the invention is to put at the public's disposal methods for diagnosing *in vitro*, particularly in humans, infections caused by the microorganisms, and more especially, tests

for diagnosing, and confirming, in particular in the cas of HIV infection, which are more effective, and more reliable than the current diagnosis methods, or confirmation tests.

Another purpose of the invention is to provide new /4
vaccination compositions based on oligomeric proteins, especially in the framework of vaccination against HIV infections.

Another purpose of the invention is to provide compositions for implementing such a process for isolating proteins in the oligomeric form.

The invention pertains to a process for the lysis of cells, or microorganisms, viruses in particular, or host cells infected by these microorganisms, with, or without modified genomes, this process enabling one to keep in an oligomeric form those proteins susceptibles of being present in such a form in the above mentioned cells, microorganisms, or host cells, while destroying the infectivity of these microorganisms, said process is characterized by the fact that it includes a step for treating these cells, microorganisms, or host cells by means of a composition containing a combination of at least two different molecules of an amphipathic character, each of these molecules containing a hydrophobic part, and a hydrophilous part.

The invention's process advantageously allows destroying the microorganisms' infectivity, and in particular the viruses (we will be again mentioning the inactivation of the infectious particles),

while maintaining all, or part of the immunogenic properties of the microorganisms, in particular thanks to maintaining their oligomeric structure.

By immunogenic properties of the proteins, one means more especially their properties of induction of the formation of antibodies, in an individual, susceptible of protecting this latter from infection by the microorganism from which the above mentioned protein originates, or by a related microorganism.

The inactivation of the infectious particles is obtained by solubilization of the non oligomeric proteins, whose biological activity is linked to the infectivity, in particular of the proteins with polymerasic activity necessary for the replication of viral particles, such as the DNA, or RNA polymerase.

The non oligomeric proteins thus solubilized in the framework of the invention's process, lose some of their physico-chemical properties, of which, the ones related to the infectivity of the particles containing them, while keeping all, or part of their immunogenic properties.

A particularly advantageous characteristic of the invention is that the above mentioned lysis process can be done at room temperature.

The invention pertains more especially to the application of such a lysis process in order to separate the oligomeric proteins with a membrane location in the above mentioned cells,

microorganisms, or host cells, in order to obtain, and if necessary, to purify, these proteins.

/5

By separation of the above membrane proteins, one should understand the possibility of separating all of the different oligomeric proteins present in the medium on which the above mentioned lysis process is applied, from the other constituents, protein or not, of these cells, microorganisms, or host cells, and if necessary, the possibility of separating these different oligomeric proteins from each other.

If necessary, the invention's process includes an additional processing step with a bridging chemical agent, such as formaldehyde, this step being done after having used the above mentioned lysis process according to the invention.

The combination of the two amphipathic molecules used in the invention's process allows, simultaneously, the solubilization of the proteins susceptible of being present in an oligomeric form in the cells, microorganisms, or host cells infected by these microorganisms, and the reconstitution of an environment similar to the one found in the membrane of these cells, microorganisms, or host cells, this environment being necessary for maintaining these oligomeric structures. One of the mechanisms possible at the origin of the reconstitution of such an environment would be that one of these two molecules be a compound (called first compound in what follows) which replaces the membrane phospholipides, and

glycolipides, while the other one is a compound (called the second compound in what follows) replacing the membrane cholesterol.

The invention's lysis process is characterized further by the fact that at least one of the two molecules of the composition used for processing the cells, microorganisms, or host cells, that is the above mentioned first compound, has the property, when it is used outside of the combination above with the second compound, of solubilizing all the proteins present in these cells, microorganisms, or host cells, and of dissociating the proteins which are in an oligomeric form (which results in monomeric structures of these proteins), this compound being used in the combination defined above with the second compound in proportions such that it conserves the property of solubilizing the proteins present in the cells, microorganisms, or host cells, and therefore of inactivating the infectious particles, while allowing one to maintain the oligomeric form of those of the proteins susceptible of being in such a form in the cells, microorganisms, or host cells.

Advantageously, the first compound defined above is constituted by one, or several hydrocarbon chains, saturated, or 6 unsaturated hydrophobics, branched or not, and with a polar head linking these hydrophobic chains together, or not.

The first compound is advantageously chosen among the compounds with the following formula:

$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_n-\text{R}$ in which:

-R represents a sulfate, phosphate group, or a halogen, in particular chlorine, or bromine,

- n is greater than or equal to 4, and preferably situated between 10, and 18.

Preferably, the first compound is chosen among the dodecyl sulfate salts, in particular sodium dodecyl sulfate (SDS), or lithium. To illustrate this, the first compound can also be chosen among the dioctyl sulfosuccinate salts (of sodium, for example), the cetyltrimethylammonium salts (of bromine, for example), the cetylpyridinium salts (of chlorine, for example), the N-dodecyl-, or N-tetradecyl-sulfobetaine, octylglucoside, lauryl maltoside, lauryldimethylamine oxide, decanoyl-N-methylglucamide, and polyethylene glycol (n) lauryl ether.

Advantageously, the second compound used in the combination defined above with the first compound, has the property of solubilizing the membrane oligomeric proteins while keeping them in oligomeric form, while preserving all, or part of their biological activity, and in particular, all or part of their immunogenic properties.

The basic hydrophobic structure of a second particularly advantageous compound, the gonane nucleus, consisting of 4 cyclic

nuclei A, B, C, and D, with 17 carbon atoms, constituting the basic structure of cholesterol, with, or without branched hydrocarbon groups at 10, or at 13, as well as hydrophilous groups on some of the 17 carbon atoms, in alpha, or beta, mainly at 3, 7, 12, esterified, or not, this basic structure being combined, or not, to another branched polar head on the D cyclic nucleus at 15, 16, or 17, directly, or not by the intermediary of a hydrocarbon chain.

A second preferred compound is represented by 3-[(3-cholamidopropyl)-dimethylamino]-1-propane sulfonate] (or CHAPS), or also by 3-[(3-cholamidopropyl)-dimethylamino]-2-hydroxy-1-propane sulfonate (or CHAPSO). As an illustration, the second compound can also be chosen among the biliary, cholic, and desoxycholic, chenodesoxycholic or lithocholic acids (of sodium, for example), the conjugated biliary, taurocholic, or glycocholic acids (of sodium, for example), and digitonine.

The different cells on which the invention's process can be 17 applied are represented by any cell of the human, or animal body, or even plant cells, with, or without modified genomes, in particular by implementing genetic manipulations, or by mutation. These cells can also be infected by microorganisms as described above.

The microorganisms on which the invention's lysis process is susceptible of being applied are represented in particular by bacteria, or human, or animal viruses (or even plant), with envelop glycoproteins susceptible of being in the oligomeric form. In the case in which these microorganisms are viruses, these latter can be responsables for the fusion of the virus-host membranes during infection, and are more especially represented by human retroviruses of the HIV-1, HIV-2, and HTLV-I, HTLV-II type, the myxoviruses, in particular, the influenza virus, the paramyxoviruses, in particular the mumps virus, and the measles virus.

The lysis process according to the invention is advantageously applied to the different types of viruses responsible for AIDS, HIV 1 or HIV 2, or a mixture of these last ones, in view of the separation, as for HIV-1, on the one hand, of a part of the HIV-1's trans-membrane envelop protein, of 41kDa described above, and known by the name of gp41 (responsible for the fusion of the membranes with the target cells during infection), in the oligomeric form, that is to say, trimeric of 120kDa, and more especially tetrameric at 160 kDa, and on the other hand, the other proteins entering into the composition of the virion, in particular the products of the "gag", "pol", and "env" viral genes, including gp120 (another product of the split described above of the precursor of the gp160

envelop protein, and which is responsible for recognizing the positive CD4 target cell) in the monomeric form.

As for the HIV-2, the application of the invention's process enables separating on the one hand the oligomeric forms of the envelop protein of 36kDa, known by the name of gp36, and on the other one, the other proteins constituting the virion, in a manner similar to HIV-1.

The lysis process according to the invention can also be applied to the different types of myxoviruses responsible for influenza, with the possibility of separating, on the one hand, a part of the HA envelop protein with hemagglutination properties in the oligomeric form, and more especially the trimeric, and on the other one, the other proteins entering into the virion's composition, themselves in oligomeric form (such as the NP protein, for example), or non oligomeric.

The invention also pertains to a process for obtaining proteins in their oligomeric form as it exists in the cell membranes, or in the microorganism membrane, characterized by the fact that it includes a step of lysis of the cells, the microorganisms, especially the viruses, or the host cells infected by these microorganisms, according to the invention's process described above, if necessary, followed by a step in itself,

/8

separating the proteins obtained during the previous step, in particular by electrophoresis in polyacrylamide gel, in the presence of sodium dodecyl sulfate, for example, enabling the separation of the proteins in function of their molecular mass, the proteins in oligomeric form remaining combined in such a form.

Advantageously the above mentioned process can be used in order to obtain said oligomeric proteins in a purified form, in particular after the previously described lysis step, or the separation one, by a purification step, in particular through immuno-affinity, or by molecular separation, and recovery of the fraction(s) containing the desired purified oligomeric protein(s).

It is clear that, after the above mentioned lysis step, performing the purification of the proteins enables obtaining a composition containing different oligomeric proteins in a combination, while performing this purification step after the separation one enables obtaining isolated, and purified oligomeric proteins.

The invention also pertains to oligomeric proteins as they are obtained by implementing the invention's above mentioned process.

The invention pertains more specifically to the above mentioned 120 kDa trimer, and 160 kDa tetramer of HIV-1 in the purified form, or also the above mentioned oligomeric forms of the gp36 of HIV-2, as they are obtained by implementing the invention's lysis process, followed by a purification step, in the manner

described above; to these oligomeric proteins thus obtained, said proteins having the characteristic of being stable at room temperature in the presence of amounts of SDS greater than, or equal to about 0.5%, in particular about 1%, and amounts of CHAPS, which are at least in the same range as those of SDS.

The invention pertains more especially to compositions of proteins in the oligomeric form obtained by implementing a process such as described above of lysis of the HIV type virus, or host cells susceptible of containing such viruses, purified if necessary, these compositions including either different oligomeric proteins among each other in combination, or identical isolated oligomeric proteins.

The invention pertains more especially to compositions containing the trimer of the HIV-1 trans-membrane envelop protein of 41kDa (or gp41), that is the 120kDa trimer described above, and/or the tetramer of this gp41, that is the 160kDa tetramer described above, and/or one, or several of the above mentioned oligomeric forms of the gp36 of HIV-2.

/9

The invention pertains more especially to compositions containing the oligomeric, and in particular trimeric, proteins of the HA protein of the myxoviruses such as the ones responsible for influenza.

The invention also pertains to the use of the compositions containing one, or several oligomeric proteins, and obtained according to the process described above for implementing diagnosis methods, or confirmation tests *in vitro* of pathologies caused by the infection of individuals (man or animal) by microorganisms susceptible of carrying such oligomeric proteins.

For this, the invention pertains to any of the above mentioned diagnosis methods, or any of the confirmation tests, done by detection of the antibodies specifically recognized by these oligomeric proteins, and susceptible of being present in biological samples, in particular in serum, originating from individuals themselves susceptible of being infected by the microorganisms in question (in particular the ones described above).

The invention pertains more especially to any method of diagnosis *in vitro* of infections caused by the different viruses of the HIV type, and which are the cause of AIDS, in humans, or in animals, or any test confirming these infections, including, if necessary, a step using the invention's lysis process on AIDS viruses, or on the cells infected by them, susceptible of being contained in a biological sample, especially in serum, taken from an individual, and a step detecting the above mentioned antibodies by means of one, or several proteins in the oligomeric form, such as the ones obtained by implementing the above mentioned lysis process.

The invention also pertains to any composition containing:

- at least a first compound, chosen among the ones described above, susceptible of solubilizing the proteins present in the cells, microorganisms, in particular viruses, or host cells infected by these microorganisms, and of dissociating (when it is used alone, or in a very large excess in relation to the second compound) the proteins which are in oligomeric form, in combination with

- at least a second compound, chosen among the ones described above, with the property of solubilizing the membrane oligomeric proteins by keeping them in an oligomeric form, while preserving /10 all, or some of their immunogenic properties,

the first compound being used in the combination defined above in proportions such that it preserves the property of solubilizing the proteins present in the cells, microorganisms, (in particular the proteins responsible for the replication of the genome of these microorganisms), or host cells, while enabling keeping in oligomeric form the cells of the proteins susceptible of being in such as form in these cells, microorganisms, or host cells.

A particularly preferred composition in the framework of the present invention is such that:

- the first compound consists of a lithium salt, or dodecyl sulfate sodium,

- the second compound is 3-[(3-cholamidopropyl)-dimethylamino]-1-propane sulfonate (or CHAPS).

To illustrate this, the amount of the first compound, and more especially that of SDS, preferably represents about 1.5 times the amount (in g/l) of the total proteins present in the biological sample to be processed according to the invention's lysis process.

In the hypothesis that one has a biological sample in which the concentration in total proteins does not exceed about 3mg/ml, the concentration of SDS is advantageously in the range of about 5mg/ml.

Preferably, the amount of the second compound, and more especially CHAPS, is at least equivalent to the first one. Advantageously, the second compound is used in an equiponderal ratio with the first compound.

Particularly preferred compositions contain about 0.5% to about 1% of each of the two SDS, and CHAPS compounds.

The invention also pertains to any process for obtaining the invention's compositions described above, and including as an example, the mixture of the first, and the second compound, as described above, if necessary in a buffered aqueous solution.

The invention also pertains to packages of reagents (or kits) for implementing a lysis process according to the invention, and including a composition containing a first compound, and a second compound in combination, as described above.

The invention also pertains to packages of reagents for implementing the diagnosis methods, or confirmation tests, as described above, and including a composition containing one, or several oligomeric proteins as obtained by implementing the invention's lysis process, and, if necessary, a composition containing a first compound, and a second compound in combination, as described above. /11

The invention also pertains to the use of one, or several oligomeric proteins, as obtained by the invention's lysis process, in order to obtain vaccine drugs, and compositions intended, respectively, for the treatment, and prevention of pathologies caused by the infections by microorganisms carrying these oligomeric proteins.

For this, the invention pertains especially to vaccines against different viruses of the HIV type, and containing one, or several proteins as obtained by implementing the invention's lysis process on HIV type viruses (in particular HIV-1, and HIV-2), or on cells infected by these viruses.

The invention pertains more especially to vaccine compositions containing the above mentioned 120kDa trimer, and/or the 160 kDa tetramer, and/or the oligomeric forms of the 36kDa envelop protein, as obtained by implementing the invention's lysis process on HIV-1 type, and/or HIV-2 viruses, in combination with a physiologically acceptable medium.

The invention pertains more especially to vaccine compositions against the different viruses responsible for influenza, containing a composition containing the oligomeric proteins, and more especially trimeric, of the HA protein, in combination with a physiologically acceptable medium.

The invention will be better illustrated by means of the detailed description which follows the execution of the invention's lysis process in order to obtain the 120kDa and 160 kDa oligomeric proteins of HIV-1 described above.

I MATERIAL AND METHODS

1-CELL AND VIRUS LINES

1-1 CEM

Lymphoblastic line isolated from the peripheral blood of a patient with acute lymphoblastic leukemia (T4+). These cells originate from the "American Tissue Culture Collection" (ATCC CC L 119), and have the reference CCRS-CEM.

1-2 CEM HIV

These are CEM cells chronically infected by the LAV BRU isolate for the CEM HIV-1, and the ROD isolate for the CEM HIV-2.

1-3 PRODUCTION OF THE VIRAL PARTICLES

The producing lines are cultivated at a density of 1 to $2 \cdot 10^6$ /12 cells/ml. The medium, containing the viral particles produced, is renewed twice a day, and kept at 4°C for a maximum of 3 days before purification.

1-4 PURIFICATION OF THE VIRAL PARTICLES

The supernatants are processed in the following manner:

- a first centrifuging for 30 min at 3,000 g enables eliminating the cell debris,
- the supernatant is removed, the viral particles in suspension settled by centrifuging for 1.5 hours at 100,000 g,
- the viral particles are placed in suspension again in TNE (Tris-HCL 0.02 M at pH7.5, NaCl 0.1 M, EDTA 0.001 M), and purified by the discontinuous gradient isopycnic banding of saccharose from 20 to 59% for 16 hours at 280,000g.

The gradient is prepared from five saccharose solutions at 20, 30, 38.5, 47, and 59% (weight/volume). It is equilibrium centrifugation in a discontinuous gradient density. The particles are therefore going to go through the successive layers of gradient until they meet a medium with a density identical to their own density ($d = 1.13$).

The viral particles are recovered at the top of the 38% saccharose fraction. The fraction containing the viral particles is diluted with two volumes of TNE, and centrifuged for 3 hours at 150,000 g to concentrate the virions. The sediment, consisting of viral particles, is then taken again with TNE.

2-SEPARATION OF THE PROTEINS THROUGH ELECTROPHORESIS IN POLYACRYLAMIDE GEL IN THE PRESENCE OF SDS

2-1 SOLUBILIZATION OF THE VIRAL PROTEINS IN OPTIMIZED

CONDITIONS.

The proteins are solubilized in the following sample buffer:

Tris-HCl pH 6.8	0.0625M
DTE (dithioerythritol)	0.100M
SDS	1%
CHAPS	1%
Glycerol	10%

2-2 ELECTROPHORESIS CONDITIONS

/13

The polyacrylamide gels are poured at a constant temperature of 20°C. The separation of the proteins is done in 1 mm thick polyacrylamide gel, made successively of:

- a resolution gel made of:

Acrylamide	12.5%
MBA (Methylene Bisacrylamide)	0.4%
Tris-HCl pH 8.8	0.375M

- and a concentration gel made of:

Acrylamide	4%
MBA	0.11%
Tris-HCl pH 6.8	0.125M

Electrophoresis buffers:

upper	Tris base	0.025M
	Glycine	0.192M
	SDS	0.1%

lower	Tris base	0.02
	Glycine	0.192M

Electrical parameters

500 volts (V)

0.5 amperes (A)

6 watts/plate (W)

600 volts.hour (V/h)

With these parameters, the migration is done at constant power, and ends when the 600 volts/hour are reached. The migration is done at a controlled, constant temperature of 20°C.

3-ELECTROTRANSFER ON NITROCELLULOSE

The proteins separated by electrophoresis are then electrotransferred to a nitrocellulose sheet, or any other equivalent medium.

4-VISUALIZATION OF THE TRANSFERRED PROTEINS

At the end of the transfer, the nitrocellulose is colored with a solution:

Ponceau red at 0.025%

Trichloroacetic acid 3.5%

This step attaches the proteins on the nitrocellulose, but /14 also enables coloring the transferred proteins, and therefore verifying the quality of the transfer. This staining is labile at a neutral pH.

5-IMMUNODETECTION

All the steps are done at room temperature, and with constant agitation. The Ponceau red is totally eliminated by rinsing with PBS.

- The nitrocellulose is saturated 30 min in a 1% skim milk solution in PBS.

- Fixation of the first antibody contained in serum diluted at 1/100th in the saturation solution, for 1 hour.

- The solution containing the first antibody is eliminated, and the nitrocellulose is rinsed 3 times, 10 min, with a 0.1% Tween 20 solution in PBS.

- The second antibody is diluted to 1,000th in PBS/Tween 20, and incubated for an hour.

- The nitrocellulose is then washed 3 times, 10 min, in PBS/Tween, then quickly rinsed in PBS.

- The visualization is done in a NBT/BCIP solution ("nitro blue tetrazolium/5-bromo-4 chloro-3 indolyl phosphate"), the reaction is stopped in distilled water.

II-RESULTS

In the conditions using the invention's process for solubilization of viral proteins, three bands corresponding to the "env" gene products can be revealed at 160, 120, and 41 kDa, which allow one to suppose, in a first approach, that it is respectively:

- the precursor, gp160;

- the external gp120 glycoprotein, which enables recognizing the CD4;

- the gp41 trans-membrane glycoprotein, which enables the fusion of the membranes.

In these conditions, however, the gp41 still appears with weak intensity, while in the conventionally used conditions of solubilization of viral proteins, the gp41 appears with greater intensity, with counter part, the absence of gp160, and gp120.

However, the results obtained with the monoclonal antibodies show that:

- the band situated at 120 kDa contains a protein which has /15 an antigenic determinant of gp 41, because an anti-gp41 monoclonal antibody recognizes the 160 kDa, and 120 kDa products simultaneously.

- the same 120 kDa product is very weakly recognized by an anti-gp120 monoclonal antibody, which itself, does not recognize the product which must be its precursor, gp160.

If one can not exclude the hypothesis that the antigenic determinant recognized by the anti-gp120 monoclonal antibody is not accessible on the non cleaved gp160 precursor, the presence of an antigenic determinant of gp41 on gp120 can not, on the contrary, be explained, because these two proteins are coded by different regions of the viral genome, and they do not have sequence homology, nor crossed immunological reactivity.

Consequently, all the antigenic determinants recognized by these anti-gp41 monoclonal antibodies are present on the 120 to 160 kDa products, and the antigenic determinants of gp120 are never detected on the 160 kDa product. This suggests that the two bands revealed in "western blot" at 120, and 160 kDa correspond to oligomeric forms of gp41.

However, the anti-gp120 monoclonal antibodies also recognize a 120 kDa product. Therefore, it is necessary to suppose that the band revealed by the immunoblots with a positive serum, corresponds to the detection of two "env" gene products, that is a multimeric form of gp41 combined with the external gp120 glycoprotein. This is compatible with the results obtained in "western blot" because, the immunoblots done with the anti-gp120 monoclonal antibodies give a band of about 1 mm in the 120 kDa region, while on the same membrane, a positive serum gives a much larger signal of about 3 to 4 mm in this region. In addition, this band recognized by the the anti-gp120 antibodies is not only narrower, but also slightly higher than the band recognized by the the anti-gp41 monoclonal antibodies.

Thus the 160 kDa product revealed on the "western blots" prepared from lysates of virus corresponds to a gp41 tetramer, and the 120 kDa band corresponds simultaneously to the gp120, and to a trimer of gp41.

The precursor coded by the env gene (gp160) will not be present in the viral particle in its non cleaved form. This point agrees with the results of Pinter et col. (1989) who, by means of an anti-gp120 monoclonal antibody, revealed the presence of gp160, and gp120 in a lysate of infected cells, while the same antibody only recognized the gp120 in the viral particles.

The addition of CHAPS, or 3-[(3-cholamidopropyl)-dimethylamino]-1-propane sulfonate] to the dissociation buffer of the viral particles appears directly responsible for maintaining /16 the oligomeric structures of the viral envelop's glycoproteins. CHAPS is a "zwitterionic" detergent whose structure is close to that of cholesterol, and which has properties close to those of other ionic detergents, like cholates, and deoxycholates. CHAPS allows a good solubilization of the membrane proteins, and prevents the formation of protein agglomerates. It has enables isolating membrane receptors without changing the properties (affinities, specificities), while these receptors lose their properties when they are extracted with other detergents [Simonds et col., 1980; Sladeczek et col., 1984; Brose et. col., 1992].

In the case of HIV, the stabilizing effect of CHAPS on the quaternary structure of the tetramer depends on the concentration in CHAPS at the time of the dissociation of the viral particles. If the CHAPS is added to the viral particles, already dissociated by the effect of the SDS, it does not allow the recombination of the

monomers. For HIV, the gp41/CHAPS interaction seems to stabilize the gp41's oligomeric conformation, which allows it to be perfectly recognized by the antibody. Without CHAPS, and at 1% of SDS, the oligomeric forms are progressively dissociated, the dissociation being accelerated by the treatment at 95°C. In addition, it has been shown that the maximum concentration of SDS tolerated by the gp41 tetramer is in the range of 0.1 to 0.15%. Above this, the tetramer is dissociated. However, it seems that the tetramers can resist higher SDS concentrations, but for a very short lapse of time (about 5 min) [Pinter et col., 1989]. These results reinforce the observations done in the laboratory with the revelation of the loss of antigenic reactivity in the area of the oligomeric forms of gp41 by processing of samples at 95°C in the presence of 1% of SDS.

One can therefore suppose that during processing of the viral particle by the solubilization buffer containing both CHAPS, and SDS:

- the CHAPS replaces the membrane cholesterol with a greater affinity for the hydrophobic amino acids implicated in the interaction with the cholesterol than that, less specific, of the SDS for these same trans-membrane hydrophobic amino acids,
- while the SDS replaces the membrane phospholipids, and glycolipids,

- the SDS-CHAPS combination tends to reconstitute the environment necessary for maintaining the oligomeric structures of the trans-membrane glycoproteins.

However, an excess of SDS, or prolonged heating at the time of the solubilization displaces the interaction in favor of the SDS, which then takes the place of CHAPS, irreversibly.

III-IMMUNOGENICITY TEST WITH MICE

/17

- Obtention de la vaccine preparation

The influenza virus, purified by ultracentrifuging on a saccharose gradient is placed in suspension again in a phosphate buffer (PBS) at pH 7.4 in a concentration of 3 mg of total protein/ml (protein proportion according to Bradford, 1976).

After sonication, the virus is processed for 18 hours at 37°C with an equal volume of a solution of detergents containing 1% of SDS, and 1% of CHAPS, in a PBS buffer at pH 7.4 DTE (dithioerythritol) 0.02M. One searches for the absence of residual virus by inoculation of 0.2 ml of the undiluted viral preparation, or diluted to 1/10 in the allantoic cavity of 10 day eyed chicken eggs; in the case of residual infectious activity, an additional inactivation step can be done by processing with 0.01% final formaldehyde for 24 hours at room temperature.

- Immunization protocol

BALB/c mice (IFFA-CREDO France), 6 weeks old, are immunized subcutaneously, in a volume of 0.5 ml, with 0-0.1-1-10 doses, and

100µg of total proteins of the inactivated viral preparation obtained previously; these doses are prepared by dilution of the preparation in a PBS buffer pH 7.4. They are administered without adjuvant. Each experimental group consists of 10 animals each receiving an identical dose of antigen.

Two immunization schemes are done in parallel, which have, or do not have a booster injection: 28 days after immunization, the groups of animals which had a single injection are bled, those which underwent a booster injection receive an injection of the same dose as during the initial immunization, and are then bled 15 days after the booster. The blood samples are done in the carotid, with ether anesthesia of the mice.

- Analysis of the serums

The serums are analyzed for their content in antibodies inhibiting the hemagglutinin activity of the influenza virus (IHA antibody). (It is admitted that in humans they have a protective signification in relation to the immunization strain for ratios in the range of 40-80).

The serums are first rid of their non specific inhibitors by /18 processing with the cholera neuraminidase (Receptor Destroying Enzyme, RDE), followed if necessary, by processing with potassium metaperiodate.

The hemagglutination inhibition reaction (Palmer, et al., 1975) uses an equal volume (in 50 µl, in a PBS buffer) of dilutions

at a rate of 2 of the processed serums, the influenza virus diluted in order to contain 4 hemagglutinin units, and the chicken red blood cells at 0.5%. The content of the serum in IHA antibodies is given by the reciprocal of the last dilution that inhibits the hemagglutinin activity of the virus.

BIBLIOGRAPHY

- Bradford (1976). *Anal. Biochem.* 72, 248-354.
- Brose, N., Petrenko, A.G., Südhof, T.C. et Jahn, R. (1992). "Synaptogamin: A calcium sensor on the synaptic vesicle surface". *Science* 256, 1021-1025.
- Copeland, C.S., Doms, R.W., Bolzau, E.M., Webster, R.G. et Helenius, A. (1986). "Assembly of influenza hemagglutinin trimers and its role in intracellular transport". *J. Cell Biol.* 103, 1179-1191.
- Doms, R.W. et Helenius, A. (1986). "Quaternary structure of influenza virus hemagglutinin after acidic treatment". 60, 833-839.
- Einfeld, D. et Hunter, E. (1988). "Oligomeric structure of a prototype retrovirus glycoprotein". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 8688-8692.
- Evans, L.A. et Levy, J.A. (1989). "Characteristics of HIV infection and pathogenesis". *Biochim. Biophys. Acta* 989, 237-254.
- Gething, M.J., McCammon, K. et Sambrook, J. (1986). "Expression of wild-type and mutant forms of influenza hemagglutinin: the role of folding in intracellular transport". *Cell* 46, 939-950.

- Kreis, T.E. et Lodish, H.F. (1986). "Oligomerization is essential for transport of vesicular stomatitis viral glycoprotein to the cell surface". *Cell* 46, 929-937.

- Pinter, A. et Fleissner, E. (1979). "Structural studies of retroviruses: characterization of oligomeric complexes of murine and feline leukemia virus envelope and core components formed upon cross-linking". *J. Virol.* 30, 157-165.

- Palmer et al. (1975). "Haemagglutination-inhibition test". *Advanced laboratory technicals for immunological diagnostic* (Ed. Welfare P.H.S., Atlanta), Immunology Ser. N° 6, Procedural guide Part 2, 25-62.)

- Pinter, A., Honnen, W.J., Tilley, S.A., Bona, C., Zaghouni, H., Gorny, M.K. et Zolla-Pazner, S. (1989). "Oligomeric structure of gp41, the transmembrane protein of human immunodeficiency virus type 1". *J. Virol.* 63, 2674-2679.

- Racevskis, J. et Sarkar, N.H. (1980). "Murine mammary tumor virus structural protein interactions: formation of oligomeric complexes with cleavable cross-linking agents". *J. Virol.* 35, 937-948.

- Simonds, W., Koski, G., Streaty, R.A., Hjelmeland, L.M. et Klee, W.A. (1980). "Solubilisation of active opiate receptors". *Proc. Natl. Sci. Acad. USA* 77, 4623-4627.

- Sladeczek, F., Bockaert, J. et Rouot, B. (1984). "Solubilization of a adrenoreceptor with a zwitterionic detergent: preservation of agonist binding and its sensitivity to GTP". *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 1116-1121.

- Takemoto, L.J., Fox, C.S., Jensen, F.C., Elder, J.H. et Lerner, R.A. (1978). "Nearest neighbor interactions of the major RNA tumor virus glycoprotein on murine cell surfaces". *Proc. Natl. Sci. Acad. USA* 75, 3644-3648.

- Varghese, J.N., Lavef, W.G. et Colman, P.M. (1983). "Structure of the influenza virus glycoprotein antigen neuraminidase at 2,9 Å resolution". *Nature* 303, 35-40.

- Wong-Staal, F. et Haseltine, W.A. (1992). "Regulatory genes of Human Immunodeficiency Viruses". in Molecular Genetic Medicine, Vol.2, Friedman, T. ed., PP 189-219.

1. Process for the lysis of cells, or microorganisms, such as viruses, or host cells infected by these microorganisms, with, or without modified genomes, in particular in order to obtain, and if necessary, to purify the proteins with a membrane location in the cells, microorganisms, or host cells, this process enabling one to keep in an oligomeric form those proteins susceptibles of being present in such a form in the above mentioned cells, microorganisms, or host cells, while destroying the infectivity of these microorganisms, said process is characterized by the fact that it includes a step for processing these cells, microorganisms, or host cells by means of a composition containing a combination of at least two different molecules (respectively called first, and second compounds) of an amphipathic character, each containing a hydrophobic part, and a hydrophilous part.

2. Lysis process according to Claim 1, characterized by the fact that at least one of the two molecules, that is the first compound, has the property, when it is used outside of the combination with the second compound, of solubilizing the proteins present in these cells, microorganisms, or host cells, and of dissociating the proteins which are in an oligomeric form, this compound being used in the combination defined in claim 1 with the second compound in proportions such that it conserves the property of solubilizing the proteins present in the cells, microorganisms,

or host cells, while allowing one to maintain the oligomeric form of those of the proteins susceptible of being in such a form in the cells, microorganisms, or host cells.

3. Lysis process according to Claim 2, characterized by the fact that the first compound is constituted by one, or several hydrocarbon chains, saturated, or unsaturated hydrophobics, branched or not, and with a polar head linking these hydrophobic chains together, or not.

4. Lysis process according to Claim 3, characterized by the /22 fact that the the first compound is chosen among the compounds with the following formula:

$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_n-\text{R}$ in which:

-R represents a sulfate, phosphate group, or a halogen, in particular chlorine, or bromine,

- n is greater than or equal to 4, and preferably situated between 10, and 18.

5. Lysis process according to one of Claims 1 to 4, characterized by the fact that the second compound used in the combination defined in claim 1, has the property of solubilizing the membrane oligomeric proteins while keeping them in oligomeric form, while preserving all, or part of their immunogenic properties.

6. Lysis process according to Claim 5, characterized by the fact that the second compound's basic hydrophobic structure is the

the gonane nucleus, consisting of 4 cyclic nuclei A, B, C, and D, with 17 carbon atoms, constituting the basic structure of cholesterol, with, or without branched hydrocarbon groups at 10, or at 13, as well as hydrophilous groups on some of the 17 carbon atoms, in alpha, or beta, mainly at 3, 7, 12, esterified, or not, this basic structure being combined, or not, to another branched polar head on the D cyclic nucleus at 15, 16, or 17, directly, or not by the intermediary of a hydrocarbon chain.

7. Lysis process according to one of Claims 1 to 6, characterized by the fact that the first compound is sodium dodecyl sulfate (or SDS), and the second compound is 3-[(3-cholamidopropyl)-dimethylamino]-1-propane sulfonate] (or CHAPS).

8. Lysis process according to one of Claims 1 to 7, characterized by the fact that it is applied to human, animal, or plant cells, or on microorganisms, or host cells infected by these microorganisms, in particular human, animal, or plant viruses, with proteins, in particular envelop glycoproteins susceptible of being in the oligomeric form, and if necessary, responsible for the fusion of the virus-host membranes at the time of infection.

9. Lysis process according to one of Claims 1 to 8, characterized by the fact that it is applied to human retroviruses of the HIV-1, HIV-2, and HTLV-I, HTLV-II type, the myxoviruses, in particular, the influenza virus, the paramyxoviruses, in particular the mumps virus, and the measles virus. /23

10. Lysis process according to one of Claims 1 to 9, characterized by the fact that it is applied to the different types of viruses responsible for AIDS, HIV 1 or HIV 2, or a mixture of these last ones, in view of the separation, as for HIV-1, on the one hand, of a part of the HIV-1's trans-membrane envelop protein, of 41kDa known by the name of GP41 (responsible for the fusion of the membranes with the target cells during infection), in the oligomeric form, that is to say, trimeric of 120kDa, and more especially tetrameric at 160 kDa, and on the other hand, the other proteins entering into the composition of the virion, in particular the products of the "gag", "pol", and "env" viral genes, including gp120 (another product of the split described above of the precursor of the gp160 envelop protein, and which is responsible for recognizing the positive CD4 target cell) in the monomeric form, and as for the HIV-2, on the one hand the oligomeric forms of the envelop protein of 36kDa, known by the name of gp36, and on the other one, the other proteins constituting the virion, in a manner similar to HIV-1.

11. Lysis process according to one of Claims 1 to 9, characterized by the fact that it is applied to the different types of myxoviruses responsible for influenza, with the possibility of separating, on the one hand, a part of the HA envelop protein with hemagglutination properties in the oligomeric form, and more

especially the trimeric, and on the other one, the other proteins entering into the virion's composition.

12. Process for obtaining proteins in their oligomeric form as it exists in the cell membranes, or in the microorganism membrane, characterized by the fact that it includes a step of lysis of the cells, the microorganisms, especially the viruses, or the host cells infected by these microorganisms, according to the process according to one of claims 1 to 11, if necessary, followed by a step in itself, separating the proteins obtained during the previous step, in particular by electrophoresis in polyacrylamide gel, in the presence of sodium dodecyl sulfate, for example, enabling the separation of the proteins in function of their molecular mass, the proteins in oligomeric form remaining combined in such a form, this last step, or the previous lysis step being themselves, if necessary, followed by a step purifying the protein, or proteins thus obtained.

13. Oligomeric proteins as obtained by implementing a /24
process according to one of claims 1 to 12.

14. Composition of oligomeric proteins as according to Claim 13, containing the trimer of the HIV-1 trans-membrane envelop protein of 41kDa (or gp41), that is the 120kDa trimer described above, and/or the tetramer of this gp41, that is the 160kDa tetramer, and/or one, or several of the oligomeric forms of the gp36 of HIV-2.

15. Composition of oligomeric proteins as according to Claim 13, containing the HA envelop protein with hemagglutinin properties in the oligomeric, and in particular trimeric form, the myxoviruses such as the ones responsible for influenza.

16. Method of diagnosis *in vitro* of pathologies caused by the infection of individuals (man, or animal) by microorganisms, in particular by viruses of the HIV type, this method including a step of detection of the antibodies specifically recognized by the oligomeric proteins as obtained by the process according to one of Claims 1 to 13, in particular the proteins according to Claim 14, these antibodies being susceptible of being present in a biological sample, especially in serum, taken from individuals themselves susceptible of being infected by the microorganisms in question.

17. Vaccine composition against different viruses of the HIV type, containing a composition according to Claim 14, in combination with a physiologically acceptable medium.

18. Vaccine composition against the different viruses responsible for influenza, containing a composition according to Claim 15, in combination with a physiologically acceptable medium.

19. Composition characterized by the fact that it contains:

- at least a first compound, susceptible of solubilizing the proteins present in the cells, microorganisms, in particular viruses, or host cells infected by these microorganisms, and of dissociating (when it is used alone, or in a very large excess in

relation to the second compound) the proteins which are in oligomeric form, in combination with

at least a second compound, with the property of /25
solubilizing the membrane oligomeric proteins by keeping them in an oligomeric form, while preserving all, or some of their immunogenic properties,

the first compound being used in the combination defined above in proportions such that it preserves the property of solubilizing the proteins present in the cells, microorganisms, or host cells, while enabling keeping in oligomeric form the cells of the proteins susceptible of being in such as form in these cells, microorganisms, or host cells.

20. Composition according to Claim 19, characterized by the fact that the first compound is sodium dodecyl sulfate (or SDS), and the second compound is 3-[(3-cholamidopropyl)-dimethylamino]-1-propane sulfonate] (or CHAPS).

21. Composition according to Claim 19, or 20, characterized by the fact that the amount of the first compound, and more especially that of SDS, preferably represents about 1.5 times the amount (in g/l) of the total proteins present in the biological sample to be processed according to the lysis process defined in one of claims 1 to 13.

22. Composition according to one of Claims 19 to 21, characterized by the fact that the amount of the second compound,

and more especially CHAPS, is at least equivalent to the first one.

23. Composition according to one of Claims 19 to 22, characterized by the fact that the SDS, and the CHAPS are used in an equiponderal ratio, and preferably contain about 0.5% to about 1% of each of these two compounds.

24. Packages of reagents (or kits) for implementing a lysis process according to one of claims 1 to 13, and including a composition according to one of Claims 19 to 23.

25. Packages of reagents for implementing a diagnosis methods according to Claim 16, including a composition containing one, or several oligomeric proteins as obtained by the process according to one of Claims 1 to 13, in particular a composition according to Claim 14, and, if necessary, a composition according to one of Claims 19 to 23.